

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

Die Rolle von Ascorbinsäure bei der Zellschädigung
durch reaktive Stickstoffspezies
Untersuchungen an L929-Mausfibroblasten

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Curd-David Badrakhan
aus Bochum
2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel
1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Kirsch
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. W. Siffert

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2006

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Badrakhan CD, Petrat F, Holzhauser M, Fuchs A, Lomonosova EE, de Groot H, Kirsch M.
The methanol method for the quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in
biological samples. J Biochem Biophys Methods. 2004 Mar 31;58(3):207-18

Curd-David Badrakhan, Frank Petrat, Michael Kirsch, Herbert de Groot

„Der Einfluss von Ascorbinsäure und Glucose auf die N_2O_3 -vermittelte Nitrosierung von
DAF-2“

beim „1. Xantener Gespräch zur Medizinisch-Biologischen Chemie. Molekulare
Wechselwirkungen in höher organisierten Systemen“ (Sonderforschungsbereich 452),
13. - 14.12.2002

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für
Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen
durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	07
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Zelllinie	14
2.1.2	Chemikalien	14
2.1.3	Reagenzien und Lösungen	15
2.1.3.1	Medium für die Zellkultur	15
2.1.3.2	“Phosphate Buffered Saline” (PBS)	15
2.1.3.3	modifizierte „Hank’s Balanced Salt Solution“ (mHBSS)	15
2.1.3.4	Phosphatpuffer für die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase Aktivität	16
2.1.3.5	Phosphat/Citrat-Puffer	16
2.1.3.6	Ascorbat-Oxidase Stammlösung	16
2.1.3.7	Lösung von Desferrioxamin	17
2.1.3.8	Lösung von 1,4-Dithio-DL-threitol	17
2.1.3.9	Puffer zur Quantifizierung von Ascorbinsäure in der Kapillarelektro- phorese	17
2.1.3.10	Puffer für die Videomikroskop-Experimente	17
2.1.3.11	Lösung von Nitroprussidnatrium	17
2.1.3.12	Lösung von Spermin-NONO	18
2.1.4	Messgeräte	18
2.1.4.1	Spektrophotometrie	18
2.1.4.2	Kapillarelektrophorese	18
2.1.4.3	Messung der Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung	18
2.1.4.4	Fluoreszenzmikroskopie	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Zellkultur	19
2.2.2	Nachweis von Dehydroascorbinsäure in Wasser	19
2.2.3	Nachweis von Ascorbinsäure in Wasser	20

2.2.4	Vergleichende Quantifizierung von Ascorbinsäure durch die Methanol- methode und durch Kapillarelektrophorese	20
2.2.5	Bestimmung der Zytotoxizität von Ascorbinsäure	20
2.2.6	Methode zur Akkumulation von Ascorbinsäure in Zellkulturproben	21
2.2.7	Nachweis von Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure in Zellkulturproben	21
2.2.8	Kalibrierung mit reiner Ascorbinsäure	25
2.2.9	Bestimmung der Stabilität von Ascorbinsäure in unbehandelten L929-Zellen in Abhängigkeit von Glucose	25
2.2.10	Bestimmung der Stabilität von Ascorbinsäure unter Inkubation mit Spermin-NONO in Abhängigkeit von Glucose	25
2.2.11	Bestimmung von Ascorbinsäure in Blutserum	26
2.2.12	Bestimmung der zellulären Proteinmenge	26
2.2.13	Fluoreszenzmikroskopische Messung intrazellulärer Nitrosierungs- reaktionen durch N_2O_3 auf Einzelzellebene	26
2.2.14	Zerfall von Nitroprussidnatrium in Abhängigkeit von Licht und Antioxidantien	27
2.3	Statistik	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Nachweis von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure mit einem neuen spektrophotometrischen Verfahren	28
3.1.1	Dehydroascorbinsäure in Wasser	28
3.1.2	Kalibrierung mit reiner Ascorbinsäure	31
3.1.3	Nachweis von Ascorbinsäure mit der Methanolmethode im Vergleich zur Quantifizierung durch Kapillarelektrophorese	33
3.1.4	Ascorbinsäure in Zellkulturproben	34
3.1.5	Ascorbinsäure in Blutserum	36
3.2	Messung der intrazellulären Nitrosierung von DAF-2 auf Einzelzell- ebene	38

3.2.1	Intrazelluläre Nitrosierung von DAF-2 durch N_2O_3 über die Freisetzung von NO aus Nitroprussidnatrium	39
3.2.2	Intrazelluläre Nitrosierung von DAF-2 durch N_2O_3 über die Freisetzung von NO aus Spermin-NONO	41
3.3	Einfluss von Glukose auf die intrazellulären Ascorbinsäurekonzentrationen in L929 unter der Inkubation mit Spermin-NONO	44
4	Diskussion	46
4.1	Nachweis von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure mittels Einzelpunktmessung	47
4.2	Bedeutung von Ascorbinsäure und Glutathion bei der intrazellulären Nitrosierung von DAF-2	50
	Zusammenfassung	53
	Literaturverzeichnis	54
	Abkürzungsverzeichnis	62
	Danksagung	63
	Lebenslauf	64

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein reaktionsfreudiges und darum kurzlebiges Radikal [32,59]. In seiner Reinform ist es ein Gas, das jedoch in biologischen Systemen zumeist in wässriger Lösung solvatisiert ist [46]. Es wird von einer Vielzahl von Zelltypen hergestellt, z.B. Gefäßendothel, Nervenzellen und Zellen des Immunsystems, und erfüllt je nach Spezialisierung der jeweiligen Zellverbände verschiedenen Aufgaben [22,74]. Die Synthese von NO verläuft jedoch in allen Zellen gleich [34]. Substrat bei der NO-Bildung ist die proteinogene Aminosäure L-Arginin. Unter Katalyse des Enzyms Stickstoffmonoxidsynthase (engl.: nitric oxide synthase = NOS) entstehen NO und die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin (Abb. 1).

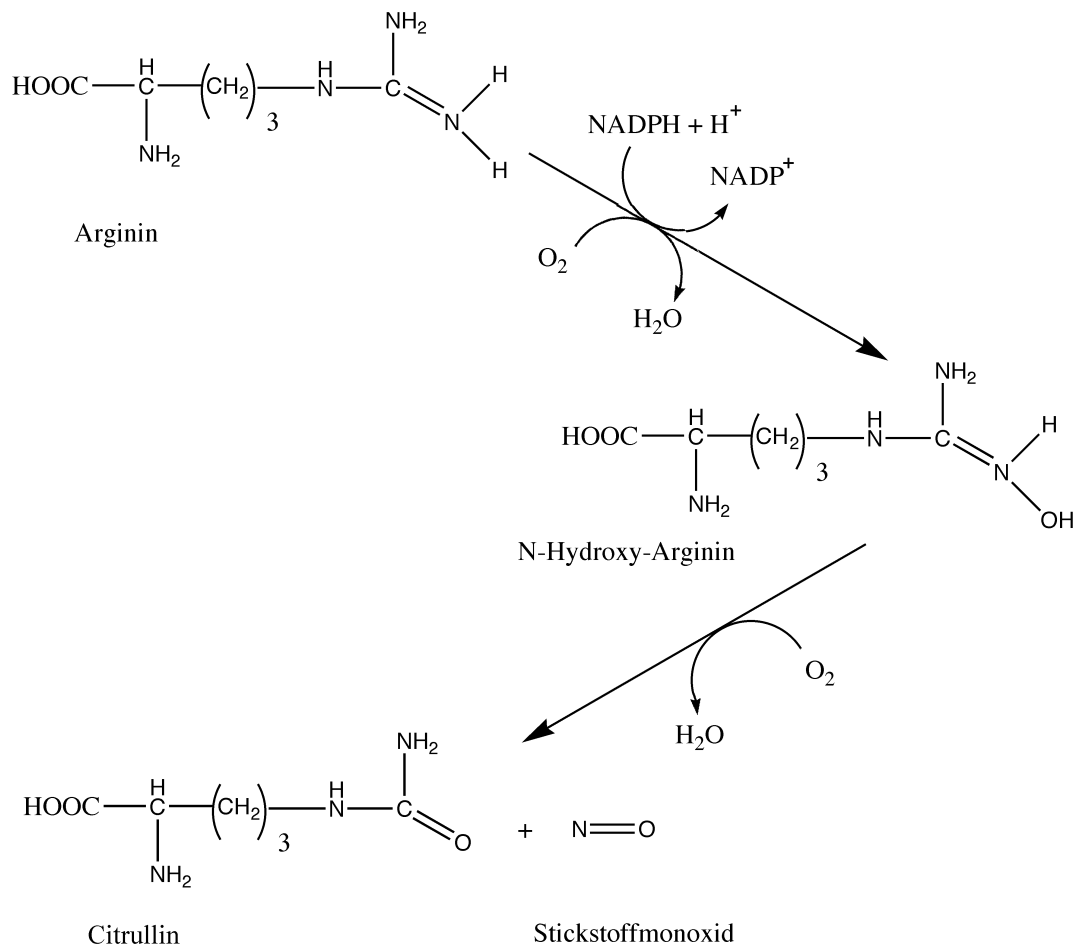


Abb. 1 Die Bildung von Stickstoffmonoxid aus Arginin.

NO entsteht *in vivo* in einer mehrstufigen Reaktion unter der Katalyse des NADPH abhängigen Enzyms Stickstoffmonoxidsynthase aus der proteinogenen Aminosäure Arginin. Produkte der Reaktion sind die Aminosäure Citrullin und Stickstoffmonoxid.

Bei der NOS werden konstitutive und induzierbare Formen unterschieden [34]. Die konstitutive Stickstoffmonoxidsynthase (cNOS) findet sich sowohl in Gefäßendothelzellen als auch in Nervenzellen und ihre Aktivität wird reguliert durch Kalzium-Calmodulin. Substanzen, die die intrazellulären Spiegel von Kalzium erhöhen, z.B. Histamin und Substanz P, bewirken so eine vermehrte Bereitstellung von NO über die konstitutive NO-Synthase. Ein weiterer, besonders im Gefäßendothel bedeutsamer Stimulus für die Aktivität der cNOS, und dadurch Auslöser für die Bildung von NO, sind Scherkräfte, die auf die Zelloberfläche wirken [34,61,74].

Die Aktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), die z.B. in Makrophagen vorkommt, ist Kalzium-unabhängig und wird durch die Vermittlung von Zytokinen (z.B. Interleukinen) sowie durch bakterielle Endotoxine (z.B. Lipopolysaccharide) gesteigert [53,57]. Nach erfolgter Induktion des Enzyms hält die Steigerung der Syntheseleistung über mehrere Stunden an. Die hierbei produzierten Mengen an NO übertreffen die Ausbeute der cNOS um das 2000fache [34].

Die konstitutive und die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase benötigen für ihre Reaktion elementaren Sauerstoff und NADPH. In beiden Enzymen fungiert Tetrahydrobiopterin als Co-Faktor [34].

Die NO produzierenden Zellen setzen es zu unterschiedlichen Zwecken ein [34,59]. In niedrigen Konzentrationen fungiert es als Signalstoff von z.B. Endothelzellen und Nervenzellen. Das von den Zellen des Gefäßendothels produzierte NO entfaltet an der glatten Gefäßmuskulatur so seine Wirkung als „Endothelium-derived relaxing factor“. Somit ist NO durch seine vasodilatierende Wirkung an der Regelung des Blutdruckes und der Organperfusion beteiligt [46].

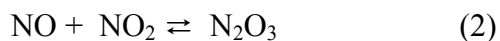
Außerdem hat NO einen antiproliferativen Effekt auf die glatte Gefäßmuskulatur und verhindert die übermäßige Aggregation von Thrombozyten am Gefäßendothel [35].

Auch pharmakologisch wird NO mittels verschiedener Donatoren (z.B. Molsidomin, Nitroprussidnatrium) als potenter Vasodilatator verwandt [72]. In höheren Konzentrationen entfaltet NO durch seine hohe Reaktivität eine zellschädigende Wirkung [3,13]. Die Phagozytose betreibenden Zellen der unspezifischen Immunantwort setzen darum unter anderem NO zur Zerstörung des von ihnen aufgenommenen körperfremden Materials ein. NO und seine Derivate sind hierbei z.B. in der Lage Nukleinsäure zu nitrosieren und damit funktionell unbrauchbar zu machen [13,32,40]. Es wird aus diesem Grund von den an der unspezifischen Immunabwehr beteiligten Zellen sezerniert, die damit an der zu schädigenden Zielzelle eine Apoptose/Nekrose induzieren [57].

Unglücklicherweise wirken überschüssige endogene oder exogene NO-Konzentrationen als Noxe und es resultiert oxidativer Stress. Gesteigerter oxidativer Stress wird bei der Pathogenese vieler Erkrankungen, wie z.B. Herzinfarkt [22], der Krebsentstehung [58], aber auch im Rahmen der Infektion durch das HI-Virus [1] angenommen.

Die Effekte von NO gründen hierbei auf zwei unterschiedlichen Wirkungsmechanismen. Viele der physiologischen Wirkungen werden *indirekt* über die Aktivierung von Signaltransduktionsketten vermittelt, z.B. über zyklisches Guanosin-mono-Phosphat (cGMP) abhängige Stoffwechselwege [74]. Die *direkte* Oxidation durch reaktive Intermediate des NOs führen zur S-Nitrosierung, zur N-Nitrosierung und zur Nitrierung von Biomolekülen [42,61]. Handelt es sich bei dem Biomolekül um eine proteinogene Aminosäure, dann kann ein ganzes Enzym/Protein in seiner Funktion eingeschränkt sein (z.B. die Nitrierung der Tyrosin-Phosphatase) [40].

Ein wichtiger Vertreter aus der Gruppe der reaktiven Stickstoffspezies ist das N_2O_3 welches sowohl in wässriger Lösung, also auch im nicht-wässrigen Milieu in einer zweischrittigen Reaktion entstehen kann:



Je höher das Angebot an NO ist, umso mehr N_2O_3 kann bei ausreichendem Angebot an Sauerstoff gebildet werden. N_2O_3 führt ebenfalls zur S-Nitrosierung, N-Nitrosierung und Nitrierung von Biomolekülen [33,75]. Diese Reaktionen sind ebenfalls an physiologischen Prozessen, z.B. im Bereich der Immunantwort [59,74], beteiligt. Ein Überangebot an N_2O_3 , z.B. durch überschüssige NO Bildung, kann zur Nitrosierung zelleigener Proteine und damit zu Störungen im Intermediärstoffwechsel führen [32,33].

Im experimentellen System kann die Menge an verfügbarem N_2O_3 mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen aus der Gruppe der α,β -Diaminoaromaten quantifiziert werden. Der Goldstandard dieser Gruppe ist das 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2). Dieser Farbstoff permeiert in seiner acetylierten Form (DAF-2-DA) die Zellmembran [35,47]. Das nachweisbare Chromophor DAF-2T entsteht durch N_2O_3 -vermittelte Nitrosierung einer primären Aminogruppen, im Zuge derer auch die benachbarte Aminogruppe angegriffen wird und es zur Bildung eines stark fluoreszierenden Triazol-Systems kommt. Cytosolisches DAF-2 kann somit zum Nachweis von intrazellulär vorhandenem N_2O_3 verwandt werden (Abb. 2).

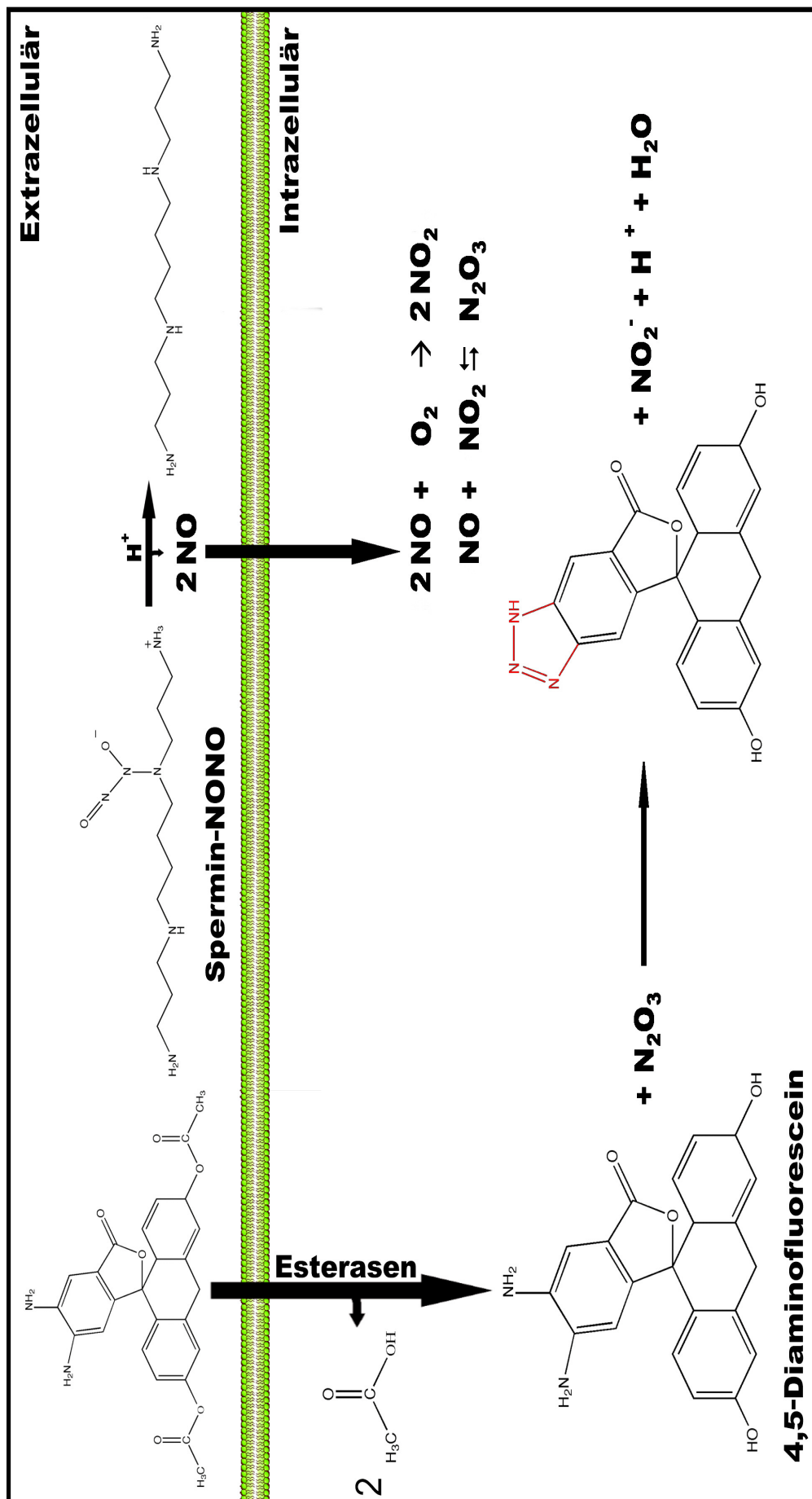


Abb. 2 Intrazelluläre Nitrosierung von DAF-2, beispielhaft über aus SPERMIN-NONO generiertem N_2O_3 . Die acetylierte Form des Farbstoffs wird extrazellulär hinzugegeben und kann wegen seiner großen Lipophilie die Zellmembran durchdringen. Intrazellulär spalten Esterasen die Acetatreste ab und überführen den Farbstoff in seine aktive Form 4,5-Diaminofluorescein. Die primären Aminoreste des 4,5-Diaminofluorescein reagieren mit N_2O_3 . Es entsteht die chromophore Gruppe.

In biologischen Systemen wirken Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C, Vitamin E und Glutathion, der Nitrosierung zelleigener Proteine im Falle eines Überangebotes an NO/N₂O₃ entgegen [5]. Diese Verbindungen sind potente Reduktionsmittel, welche zum einen die reaktiven Stickstoffspezies direkt abfangen, zum anderen aber auch nitrosierte Biomoleküle durch Reduktion dieser Verbindungen vollständig reparieren können. In metabolisch ausgeglichenen biologischen Systemen besteht ein Fließgleichgewicht zwischen der Bildung der Oxidantien NO/N₂O₃ und ihrem Abbau durch Antioxidantien, wie z.B. Glutathion, Ascorbinsäure und Vitamin E [6,29,62,73].

Sowohl Ascorbinsäure, als auch Glutathion können direkt mit N₂O₃ reagieren, wobei als Hauptprodukte NO₂⁻, NO und Dehydroascorbinsäure [31] bzw. Nitrosoglutathion [33] entstehen. Oxidierte Ascorbinsäure kann unter Glutathion-Verbrauch reduziert werden [51]. Dabei ist es noch strittig, ob dies vornehmlich direkt oder unter Katalyse eines spezialisierten Enzyms im Sinne einer Dehydroascorbat-Reduktase geschieht [17,70]. Oxidiertes Glutathion kann durch Reduktionsäquivalente, die aus dem Glukose-Stoffwechsel bereit gestellt werden (z.B. NADPH⁺+H⁺), reduziert werden [41,51].

Bislang war es unklar, welche Bedeutung den in der Zelle vorhandenen Antioxidantien bei der Neutralisation von intrazellulär gebildetem N₂O₃ zukommt und welches das Hauptangriffsagens in der Reaktion mit N₂O₃ bildet (Abb. 3).

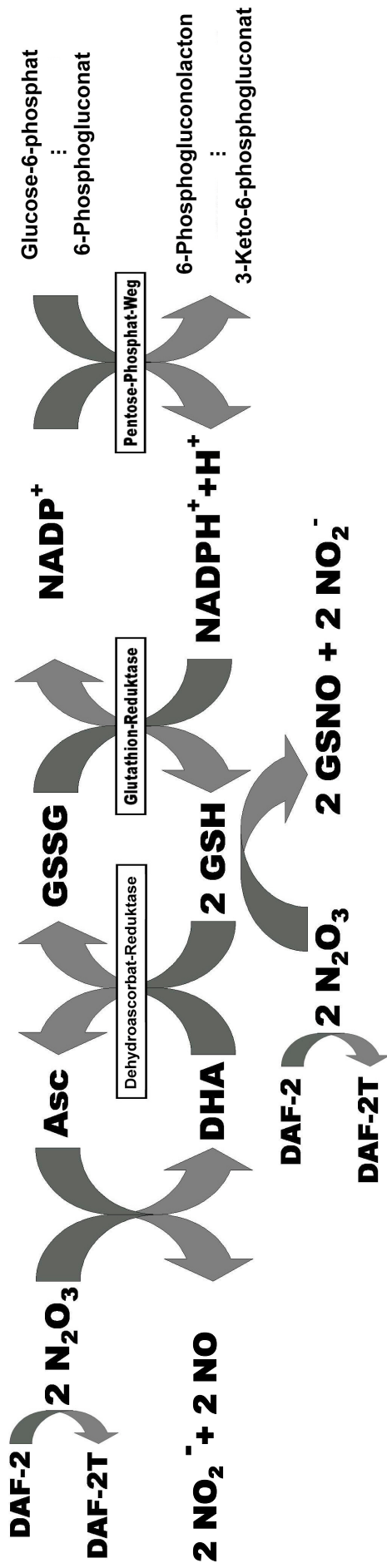


Abb 3. Die intrazellulären Reaktionen von N_2O_3 , DAF-2, Ascorbinsäure und Glutathion.

Der Fluoreszenzfarbstoff 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2) permeiert die Zellmembran und kann somit auch zum intrazellulären Nachweis von Nitrosierungsreaktionen bzw. deren Unterdrückung durch vorherige Neutralisation von N_2O_3 durch zelleigene Antioxidantien genutzt werden. Sowohl Ascorbinsäure, als auch Glutathion können direkt mit N_2O_3 reagieren, wobei als Hauptprodukte NO_2^- , NO und Dehydroascorbinsäure bzw. Nitrosglutathion entstehen. Oxidierte Ascorbinsäure kann unter Glutathion-Verbrauch reduziert werden. Dabei ist es noch strittig, ob dies vornehmlich direkt oder unter Katalyse eines spezialisierten Enzyms im Sinne einer Dehydroascorbat-Reduktase geschieht. Oxidiertes Glutathion kann durch Reduktionsäquivalente, die aus dem Glukose-Stoffwechsel bereit gestellt werden (z.B. $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$), reduziert werden. Durch DL-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin (BSO) kann die Funktion des Enzyms Glutathion-Synthase gehemmt und dadurch die Glutathion-Konzentration effektiv vermindert werden. Es verbleiben nur geringe Mengen an Glutathion in der Zelle.

Ascorbinsäure ist als wasserlösliches Vitamin an einer Vielzahl biochemischer Reaktionen beteiligt, wie z.B. an der Produktion von Kollagen und Noradrenalin [45]. Außerdem wirkt sie als Antioxidans gegenüber reaktiven Sauerstoff- [14,39] und Stickstoffspezies [23,31,32]. Während der letzten Jahre ist Ascorbinsäure wieder zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Betrachtung gerückt, da sie an der Freisetzung von NO unter verschiedenen Bedingungen beteiligt ist [22,23,33]. Aus dem gesteigerten Interesse an den Reaktionen, die Ascorbinsäure im Intermediärstoffwechsel eingehen kann, erwuchs der Bedarf an einem Nachweisverfahren für Ascorbinsäure in biologischen Proben, besonders in Zellkulturen. Ascorbinsäure kann effektiv mit chromatographischen Methoden, wie z.B. HPLC [12,38,49,68] oder radiochemisch unter Verwendung von ^{14}C -markierter Ascorbinsäure [54,69], quantifiziert werden. Diese aufwendigen Techniken stehen nicht jedem biochemischen Laboratorium zur Verfügung. Um den Nachweis zu vereinfachen, wurden verschiedene spektrophotometrische Verfahren für den Nachweis von Ascorbinsäure und ihrer oxidierten Form, Dehydroascorbinsäure, entwickelt [4,36,69].

Seit langem ist bekannt, dass bei der Reaktion von Dehydroascorbinsäure mit Methanol eine Vielzahl von Methylketalen mit einem gemeinsamen Extinktionsmaximum bei 346 nm entstehen [28,50]. Moeslinger *et al.* [43] nutzten diese Reaktion, um 1994 ein hochspezifisches Verfahren für den Nachweis von Dehydroascorbinsäure in Blutplasma und Zellkulturen vorzustellen. Unglücklicherweise bedarf es bei dieser Form der Analyse einer nicht-enzymatischen Kinetik und der Registrierung einer großen Zahl von Messpunkten [20,43]. In einer zweiten Veröffentlichung erklärten Moeslinger *et al.* [44], dass auch Ascorbinsäure nach diesem Protokoll detektiert werden kann, sofern zunächst eine Oxidation zu Dehydroascorbinsäure, z.B. mit L-Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3), erfolgt.

Inspiziert von diesen Untersuchungen kann nachfolgend eine grundlegende Modifikation der Methanolmethode vorgestellt werden, die eine Bestimmung von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in biologischen Proben, insbesondere in Zellkulturen, ermöglicht, und deren Validität die eines kommerziell vertriebenen Testansatzes übersteigt [2]. Unter Verwendung von DAF-2 und dem Einsatz eines Videomikroskopsystems kann zudem nachfolgend erstmals die intrazelluläre Nitrosierung von DAF-2 durch N_2O_3 in Abhängigkeit vom Redoxstatus der Zelle auf Einzelzellebene untersucht werden. Mit Hilfe der Methanolmethode kann ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Ascorbinsäurekonzentration und der nitrosierenden Effektivität von N_2O_3 in L929-Mausfibroblasten hergestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Es wurde die Mausfibrosarcom-Zelllinie L929, ein Klon der L-Linie, verwandt, die über „American Type Culture Collection“ (ATCC) bezogen wurde.

2.1.2 Chemikalien

Riedel de Haën, Selze	Methanol
Sigma, Taufkirchen	Desferrioxamin, Dehydroascorbinsäure, meta-Phosphorsäure, Chelex 100, Minimum Essential Medium, 1,4-dithio-DL-threitol, DL-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin
Merck, Darmstadt	KOH, NaOH, Zitronensäure-1-hydrat, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Triton X-100, Ascorbinsäure, NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , Glucose
Life Technologies, Karlsruhe	Penicillin, Streptomycin
Biochrom, Berlin	Fötale Kälberserum
Gibco BRL, Eggenstein	Trypsin
Situs, Frankfurt	Spermin-NONO
Alexis, Grünberg	4,5 Diaminofluorescein-2-diacetat (DAF-2-DA)
Roche Biochemicals, Berlin	Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3)

Alle Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden ohne weitere Aufreinigung verwandt.

2.1.3 Reagenzien und Lösungen

2.1.3.1 Medium für die Zellkultur

Minimum Essential Medium Eagle mit Earle's Salzen wurde ergänzt durch:

25	mM	NaHCO ₃
2	mM	L-Glutamin
10	%	fötales Kälberserum
100	U/ml	Penicillin
100	µg/ml	Streptomycin

pH 7,3

2.1.3.2 “Phosphate Buffered Saline” (PBS)

136	mM	NaCl
5,40	mM	KCl
10,20	mM	Na ₂ HPO ₄
1,46	mM	KH ₂ PO ₄

pH 7,3

2.1.3.3 modifizierte “Hank's Balanced Salt Solution” (mHBSS)

136,75	mM	NaCl
5,30	mM	KCl
0,44	mM	KH ₂ PO ₄
0,41	mM	MgCl ₂ • 6 H ₂ O
0,41	mM	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
0,34	mM	Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O
25	mM	Gly-Gly-Gly

pH 7,25

2.1.3.4 Phosphatpuffer für die Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität

50 mM K_2HPO_4 , mit 50 mM KH_2PO_4 auf pH 7,5 titriert, angereichert mit 0,19 mM NADH und 0,6 mM Pyruvat direkt vor dem Experiment

2.1.3.5 Phosphat/Citrat-Puffer

400 mM	NaH_2PO_4
125 mM	Zitronensäure-1-hydrat

pH mit NaOH Plättchen auf 7,75 eingestellt

Dieser Puffer wurde in Portionen von 2 ml aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Nach Wiedererwärmung auf 37°C wurde er ständig bei dieser Temperatur aufbewahrt, um ein Auskristallisieren der Salze bei Raumtemperatur zu verhindern.

2.1.3.6 Ascorbat-Oxidase-Stammlösung

Der pH einer 100 mM KH_2PO_4 Lösung wurde auf pH 6 durch vorsichtiges Zufügen von 100 mM K_2HPO_4 eingestellt. Eine Stammlösung von Ascorbat-Oxidase wurde durch Lösen von 300 U in einer Mischung von 2,5 ml Glycerol und 2,5 ml des $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ Puffers (pH 6) hergestellt. Aliquots von 100 μl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden bei -20°C und unter Lichtausschluß aufbewahrt.

Für die Leerwertbestimmung wurde eine Lösung von Glycerol und 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ Puffer (1:1 v/v, pH 6) benötigt.

2.1.3.7 Lösung von Desferrioxamin

Eine 15,4 mM Lösung von Desferrioxamin in Aqua bidest. wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt und innerhalb von sechs Stunden verbraucht oder verworfen.

2.1.3.8 Lösung von 1,4-Dithio-DL-threitol

Eine 40%ige Lösung 1,4-Dithio-DL-threitol in Aqua bidest. wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt und innerhalb von sechs Stunden verwendet.

2.1.3.9 Puffer zur Quantifizierung von Ascorbinsäure mittels Kapillarelektrophorese

10 mM Tris

10 mM NaH₂PO₄

pH 7,56

2.1.3.10 Puffer für die Videomikroskop-Experimente

Probenecid (Stammlösung 0,466 mM in 0,5 M NaOH) wurde zu einer Endkonzentration von 1,25 µM in modifizierter HBSS gelöst. Nach 15 Minuten Begasung mit CO₂ wurden 2 mM L-Glutamin beigefügt. Der pH wurde mit 1 M NaOH Lösung auf 7,25 eingestellt. In Abhängigkeit von der Fragestellung wurde der Puffer mit 10 mM Glucose angereichert oder ohne diesen Zusatz verwandt.

2.1.3.11 Lösung von Nitroprussidnatrium

Eine 32 mM Stammlösung von Nitroprussidnatrium und eine 200 mM Lösung von L-Cystein wurden direkt vor Versuchsbeginn unter Lichtausschluß in Aqua bidest. hergestellt und in gleichem Verhältnis gemischt.

2.1.3.12 Herstellung einer Lösung von Spermin-NONO

Eine 2,5 mM Stammlösung wurde direkt vor Versuchsbeginn in eiskalter modifizierter HBSS hergestellt.

2.1.4 Messgeräte

2.1.4.1 Spektrophotometrie

Alle spektrophotometrischen Analysen wurden bei 37°C mit dem SPECORD S 100 Dioden-Array-Spektrophotometer durchgeführt (Analytik Jena, Jena), das mit einer Vorrichtung zur Temperierung der Küvetten ausgerüstet war.

2.1.4.2 Kapillarelektrophorese

Elektrophoretische Messungen wurde an einer Kapillarelektrophorese des Modells P/ACE System 5000 (Beckmann, Dortmund) durchgeführt.

2.1.4.3 Messung der Laktat-Dehydrogenase-Freisetzung

Die Aktivität von Laktat-Dehydrogenase, die während des Verlustes der Zellmembranintegrität von L929-Zellen freigesetzt wurde, wurde photometrisch mit einem APC 5040 (Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

2.1.4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Messungen auf Einzelzellebene wurden mit dem digitalen Fluoreszenzmikroskopsystem Axiovert 135 TV (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Dieses war gekoppelt mit dem bildgebenden „Attofluor Fluorescence Analyzer“-System (Atto Instruments, Rockville/USA). Die Temperatur der Zellen in den Messkammern wurde durch

den Mikroskopisch bei 37°C konstant gehalten. Um Verdunstungseffekte zu vermeiden wurden die Messkammern mit einem Deckglas bedeckt. Nachdem die Morphologie der Zellen, sowie die intrazelluläre Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes beurteilt wurde, erfolgte die Wahl definierter zellulärer Messbereiche (Regions of Interest) in einem repräsentativen Gesichtsfeld. Die Anregung von DAF-2 erfolgte unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen in definierten Zeitabständen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

L929-Zellen wurden in Gewebekulturflaschen (75 cm²/250 ml) der Firma Falcon (Heidelberg) bei 37° C in einem Luft/CO₂-Gemisch (95/5 %) kultiviert.

Zur Subkultivierung der Zellen wurde das Medium (MEM Eagle, siehe 2.1.3.1) abgesaugt und 3 ml einer 1%-igen Trypsinlösung wurden in das Kulturgefäß pipettiert. Nach 3-5-minütiger Inkubation bei 37° C waren die Zellen vom Gefäßboden abgelöst und konnten nach kurzer Resuspension in neue Kulturgefäße überführt werden. 5*10⁴ Zellen waren ausreichend, um innerhalb von 3-4 Tagen erneut einen konfluenten Zellrasen entstehen zu lassen. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich subkultiviert und von der fünften bis zur zwanzigsten Passage für Experimente verwendet.

2.2.2 Nachweis von Dehydroascorbinsäure in Wasser

Dehydroascorbinsäure wurde in zweimal destilliertem Wasser in Konzentrationen von 0 – 400 µM gelöst. 400 µl dieser Lösungen wurden mit 200 µl Methanol und 400 µl des Phosphat/Citrat-Puffers (2.1.3.5) versetzt und bei 37°C über 30 Minuten inkubiert. Der Anstieg der Absorption bei 346 nm wurde alle 30 Sekunden bestimmt.

2.2.3 Nachweis von Ascorbinsäure in Wasser

Ascorbinsäure wurde in zweimal destilliertem Wasser in Konzentrationen von 0 – 400 μM gelöst. Zu 400 μl dieser Lösungen wurden 10 μl Ascorbat-Oxidase-Lösung (2.1.3.6) zugefügt und es wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 30 μl Desferrioxamin-Lösung (2.1.3.7), 200 μl Methanol und 400 μl des Phosphat/Citrats Puffer (2.1.3.5) nacheinander beigelegt. Nach 30 minütiger Inkubation der Proben bei 37°C wurde die Extinktion bei 346 nm bestimmt.

2.2.4 Vergleichende Quantifizierung von Ascorbinsäure durch die Methanolmethode und durch Kapillarelektrophorese

Ascorbinsäure wurde in Konzentrationen von 0, 25, 50, 100, 200 und 400 μM in Aqua bidest. gelöst. Der Ascorbinsäuregehalt dieser Versuchslösungen wurde bei einer Spannung von 20 KV und einer Stromstärke von 22 μA gegen eine Standardlösung (10 $\mu\text{l/ml}$ einer 10 mM Lösung von para-Hydroxybenzoesäure) aufgetrennt. Die resultierenden Flächen unter den Peaks für den Standard und die jeweilige Ascorbinsäurekonzentration wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt, so dass ein bereinigter Quotient entstand. Zum Vergleich der Nachweisfähigkeit von Ascorbinsäure zwischen der spektrophotometrischen Methanol-Methode und der Kapillarelektrophorese wurden beide Systeme jeweils mit den gleichen Kalibrierungslösungen geeicht. Danach wurde der Gehalt von Ascorbinsäurelösungen der Konzentrationen 62,5 μM , 125 μM , 225 μM und 315 μM sowohl mit der Kapillarelektrophorese als auch mit der Methanolmethode bestimmt. Schließlich wurden diese Ergebnisse gegeneinander aufgetragen.

2.2.5 Bestimmung der Zytotoxizität von Ascorbinsäure

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration von Ascorbinsäure im Substitutionsmedium wurden L929-Zellen für 24 Stunden in MEM inkubiert, das mit 0 bis 4000 μM Ascorbinsäure angereichert war. Im Zuge der Zellschädigung kommt es zum Verlust der Membranintegrität und dadurch zur Freisetzung zytosolischer Enzyme, wie z.B. der Laktat-Dehydrogenase (LDH), in das umgebende Medium.

Das Ausmaß der Zellschädigung und somit der Zytotoxizität der Ascorbinsäure wurde nach Murphy *et al.* [46] durch Messen der Aktivität von extra- und intrazellulärer Laktat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.28) quantifiziert: Nach Ende der Inkubationsperiode wurde die extrazelluläre Aktivität von LDH in MEM bestimmt. Nachfolgend wurde das Detergens Triton X-100 (1%) den Zellen beigefügt und nach 15-minütiger Inkubation bei 37° C die intrazelluläre Aktivität von LDH bestimmt. Das Ausmaß der Zellschädigung wurde von der extrazellulären Aktivität von LDH abgeleitet und als prozentualer Anteil der Gesamt-LDH-Aktivität (extrazelluläre + intrazelluläre Aktivität) angegeben.

Der Ablauf der zugrundeliegenden Reaktion



wurde anhand der Abnahme der NADH-spezifischen Extinktion bei 334 nm gemessen.

Für die Berechnung wurde der NADH-spezifischen Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{334}=6180$ (mol/l)⁻¹cm⁻¹ verwandt [46].

2.2.6 Methode zur Akkumulation von Ascorbinsäure in Zellkulturproben

5*10⁶ L929-Zellen wurden auf Zellkulturschalen (177 cm²) ausgesät und für 24 Stunden in MEM inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 30 ml MEM, das mit 0 - 400 µM Ascorbinsäure angereichert war, ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert.

2.2.7 Nachweis von Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure in Zellkulturproben

Nach 24-stündiger Inkubation mit 0 - 400 µM Ascorbinsäure wurden die Zellkulturproben dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 350 µl 8%-iger meta-Phosphorsäure abgeschabt. Nun wurden die Zellkulturplatten zweimal mit 350 µl 8%-iger meta-Phosphorsäure abgespült. Diese Waschlösungen wurden mit dem Zelllysat vereinigt, so dass ein Endvolumen von ca. 1200 µl entstand. Hernach wurde die Zellsuspension im Ultraschallbad behandelt, um die Zelllyse zu unterstützen. Nach einer Zentrifugation bei

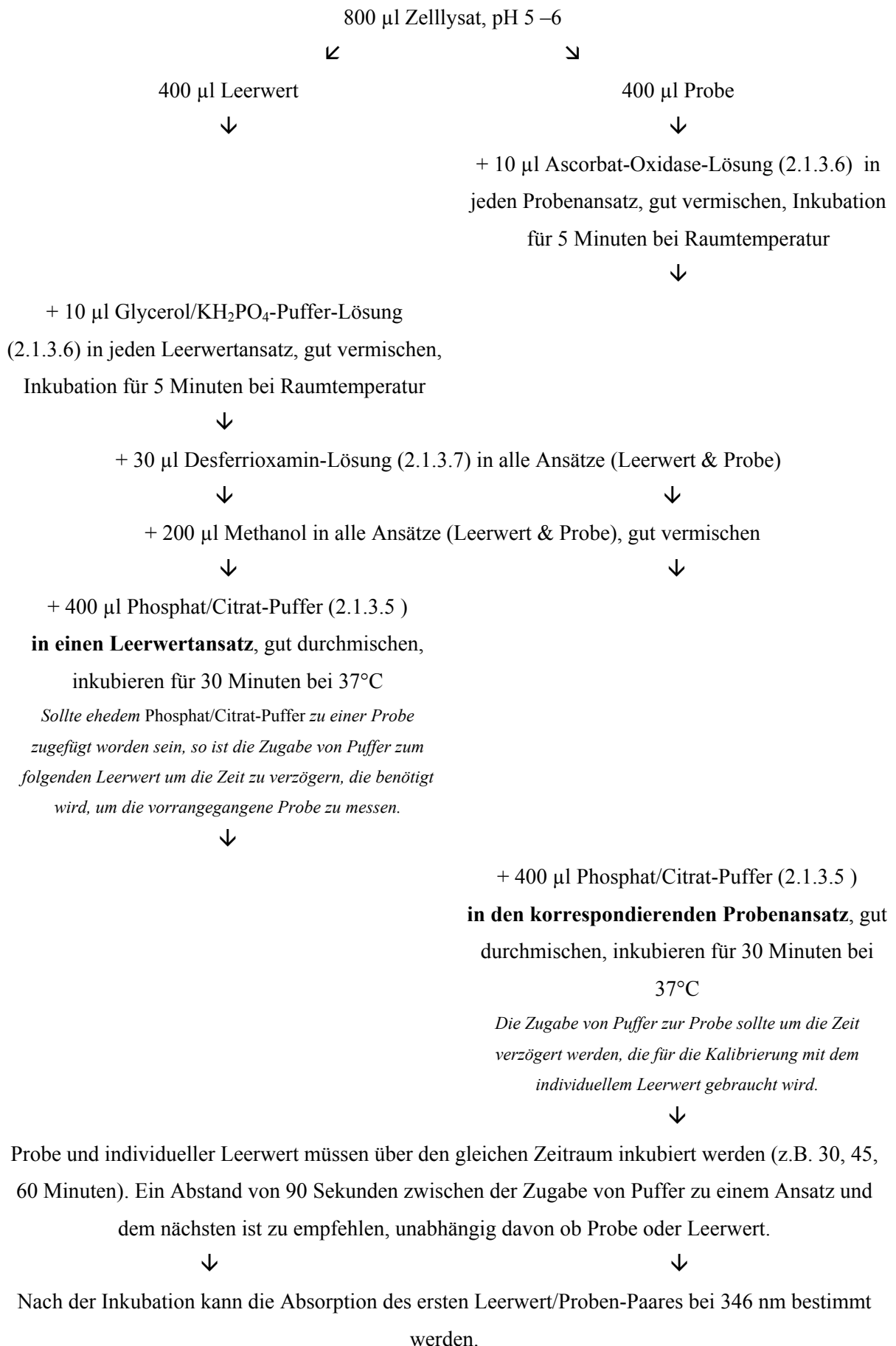
11000*g über 5 Minuten, wurde der Überstand (ca. 1 ml) abgesaugt und in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Der pH wurde mit 2,7 M KOH-Lösung auf pH 5-6 eingestellt. Wenn nötig, wurde 2-fach destilliertes Wasser zugefügt, um ein Endvolumen von 1,1 ml zu erreichen.

Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure wurden entsprechend Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 bestimmt.

Tabelle 1: Bestimmung von Dehydroascorbinsäure

800 µl Zelllysate, pH 5 –6	
↙	↘
400 µl Leerwert	400 µl Probe
↓	↓
+ 30 µl Desferrioxamin-Lösung (2.1.3.7) in alle Ansätze (Leerwert & Probe)	
↓	↓
+ 30 µl 1,4-Dithio-DL-threitol-Lösung (2.1.3.8)	
in jeden der Leerwertansätze, gut vermischen,	
Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur	
	+ 30 µl 2-fach destilliertes Wasser in jeden der
	Probenansätze
↓	↓
+ 200 µl Methanol in alle Ansätze (Leerwert & Probe)	
↓	↓
+ 400 µl Phosphat/Citrat-Puffer (2.1.3.5)	
in einen Leerwertansatz , gut durchmischen,	
inkubieren für 30 Minuten bei 37°C	
<i>Sollte ehemals Phosphat/Citrat-Puffer zu einer Probe</i>	
<i>zugefügt worden sein, so ist die Zugabe von Puffer zum</i>	
<i>folgenden Leerwert um die Zeit zu verzögern, die benötigt</i>	
<i>wird, um die vorrangigere Probe zu messen.</i>	
	+ 400 µl Phosphat/Citrat-Puffer (2.1.3.5)
	in den korrespondierenden Probenansatz , gut
	durchmischen, inkubieren für 30 Minuten bei
	37°C
	<i>Die Zugabe von Puffer zur Probe sollte um die Zeit</i>
	<i>verzögert werden, die für die Kalibrierung mit dem</i>
	<i>individuellem Leerwert gebraucht wird.</i>
↓	↓
Probe und individueller Leerwert müssen über den gleichen Zeitraum inkubiert werden (z.B. 30, 45, 60 Minuten). Ein Abstand von 90 Sekunden zwischen der Zugabe von Puffer zu einem Ansatz und dem nächsten ist zu empfehlen, unabhängig davon, ob Probe oder Leerwert.	
↓	↓
Nach der Inkubation kann die Absorption des ersten Leerwert/Proben-Paares bei 346 nm bestimmt werden.	

Tabelle 2: Bestimmung von Ascorbinsäure



2.2.8 Kalibrierung mit Ascorbinsäure

Ascorbinsäure wurde in Konzentrationen von 0 bis 8 mM in Wasser gelöst. Um größtmögliche Vergleichbarkeit zwischen der Kalibrierung und der Zelllyse bzw. Bearbeitung der Serumproben zu erreichen, wurden 20 µl der Eichlösung mit 160 µl meta-Phosphorsäure versetzt und mit 2,7 M KOH-Lösung auf pH 5-6 eingestellt. Das Endvolumen wurde mit destilliertem Wasser auf 1,1 ml aufgefüllt. Die folgenden Schritte wurden analog zu 2.2.7 durchgeführt.

2.2.9 Bestimmung der Stabilität von Ascorbinsäure in unbehandelten L929-Zellen in Abhängigkeit von Glucose

L929 Zellen wurden für 24 Stunden in MEM mit 200 µM Ascorbinsäure inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurde das Zellkulturmedium durch 20 ml modifizierten HBSS \pm 10 mM Glucose ersetzt. Die Menge intrazellulärer Ascorbinsäure wurde sofort, nach zwei, vier, sechs sowie nach acht Stunden bestimmt.

2.2.10 Bestimmung der Stabilität von Ascorbinsäure unter Inkubation mit Spermin-NONO in Abhängigkeit von Glucose

24 Stunden nach Inkubation mit 200 µM Ascorbinsäure in MEM wurden die Zellen (20×10^6) zweimal mit modifiziertem HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 18 ml dieses Puffers \pm 10 mM Glucose überschichtet. Die Menge an intrazellulärer Ascorbinsäure wurde sofort bestimmt. Eine 10 mM Stammlösung von Spermin-NONO wurde direkt vor Gebrauch in einer eiskalten Lösung von modifizierter HBSS hergestellt.

2 ml dieser Stammlösung wurden den Versuchsansätzen zugegeben, so dass ein Endvolumen von 20 ml und eine Endkonzentration von 1 mM Spermin-NONO erreicht wurde.

Die Menge an intrazellulärer Ascorbinsäure wurde zwei, vier, sechs und acht Stunden nach Versuchsbeginn bestimmt.

2.2.11 Bestimmung von Ascorbinsäure in Blutserum

Gesunden Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe wurde Blut in Gerinnungsfaktor-enthaltende Monovetten abgenommen. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 2000*g wurde das überstehende Serum weiter bearbeitet. Zur Bestimmung der zugefügten Menge an Ascorbinsäure wurden 20 µl Serum mit 160 µl meta-Phosphorsäure gemischt. Die denaturierten Proteine wurden mit einer siebenminütigen Zentrifugation bei 16000*g entfernt.

Die nachfolgenden Schritte wurden entsprechend dem bereits beschriebenen Algorithmus durchgeführt. Eine weitere Zentrifugation für sieben Minuten bei 16000*g wurde nach der Zugabe von Methanol durchgeführt, um erneut ausfallendes denaturiertes Protein zu entfernen. Die im Serum enthaltene Ascorbinsäure wurde zunächst bestimmt und dann durch wiederholtes Gefrieren und Auftauen eliminiert. Anschließend wurde Ascorbinsäure in Konzentrationen von 0 – 890 µM in diesem Serum gelöst und nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt.

2.2.12 Bestimmung der zellulären Proteinmenge

Der Proteingehalt der biologischen Proben wurde nach der Methode von Bradford [7] bestimmt.

2.2.13 Fluoreszenzmikroskopische Messung intrazellulärer Nitrosierungsreaktionen durch N_2O_3 auf Einzelzellebene

$2 \cdot 10^5$ L929-Zellen wurden für 24 Stunden in 2 ml MEM auf sterilen Glasplättchen (Ø 28 mm) in Petrischalen (Ø 35 mm) vorinkubiert, um ein Anheften der L929-Mausfibroblasten an der gläsernen Unterlage zu gewährleisten. In Abhängigkeit von der Fragestellung wurde das Kulturmedium entweder durch MEM ohne weitere Zusätze (siehe 2.1.3.1), durch MEM mit 200 µM Ascorbinsäure oder durch MEM mit sowohl 200 µM Ascorbinsäure als auch 200 µM BSO substituiert. Diese Ansätze wurde für weitere 24 Stunden bei 37° C und 95%Luft/5% CO₂ inkubiert.

Intrazelluläre Nitrosierungsreaktionen durch N_2O_3 wurden auf Einzelzellebene mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-2 quantifiziert. Der Farbstoff wurde bei 488 nm (Anregungsmaximum 495 nm) angeregt und die Emission bei 500-530 nm (Emissionsmaximum 515 nm) detektiert. Vor der Inkubation mit dem Farbstoff wurden die Zellen auf den Glasplättchen zweimal mit modifizierter HBSS (37°C) gewaschen und in kleine Petrischalen (Ø 35 mm) überführt. Unter Lichtausschluss wurden 2 µl einer 5 mM Lösung von DAF-2-DA in DMSO in 998 µl des unter 2.1.3.9 beschriebenen Puffers für Videomikroskop-Experimente gelöst. Diese Lösung wurde in die Petrischalen gegeben und die Zellen für 120 Minuten unter komplettem Lichtausschluß bei 37° C und 95%Luft/5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die zellbedeckten Glasplättchen dreimal mit modifiziertem HBSS (37°C) gewaschen und in eine der Messkammern eingepasst. 2,7 ml des 37° C warmen Puffers für Videomikroskop-Experimente wurden vorsichtig in die Messkammer gegeben. Die Basisfluoreszenz der Zellen wurde sofort, nach 180 und nach 360 Sekunden gemessen. Sofort nach Messung des 360-Sekunden Wertes wurden 300 µl Nitroprussidnatrium- oder Spermin-NONO-Lösung (NO-Donatorlösung) in die Messkammer gegeben. So wurden während der Experimente Endkonzentrationen von 1,6 mM Nitroprussidnatrium und 10 mM L-Cystein, beziehungsweise von 250 µM Spermin-NONO erreicht. Die Fluoreszenz wurde alle 180 Sekunden über einen Zeitraum von einer halben (Nitroprussidnatrium), bzw. zwei Stunden (Spermin-NONO) gemessen.

2.2.14 Zerfall von Nitroprussidnatrium in Abhängigkeit von Licht und Antioxidantien

15 mM Nitroprussidnatrium wurden in Wasser gelöst und mit 7,5 mM Ascorbinsäure oder 7,5 mM Glutathion oder ohne weitere Zusätze unter ständiger Durchmischung bei 37°C inkubiert. Die Extinktion bei 395 nm wurde zu den Zeitpunkten 0, 1800 und 3600 Sekunden bestimmt.

2.3 Statistik

Alle Experimente wurden wenigstens dreimal durchgeführt. Soweit möglich und sinnvoll, wurden die Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben, ansonsten erfolgte die Darstellung repräsentativer Daten.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure mit einem neuen spektrophotometrischen Verfahren

3.1.1 Dehydroascorbinsäure in Wasser

Die nachweisbaren Produkte dieser Methode sind Ketale, die durch die Reaktion von Dehydroascorbinsäure mit Methanol in Phosphat/Citrat-Puffer gebildet werden (Abb. 4). Diese Ketale haben ein gemeinsames Absorptionsmaximum bei 346 nm, welches zur spektrophotometrischen Quantifizierung genutzt werden kann [20].

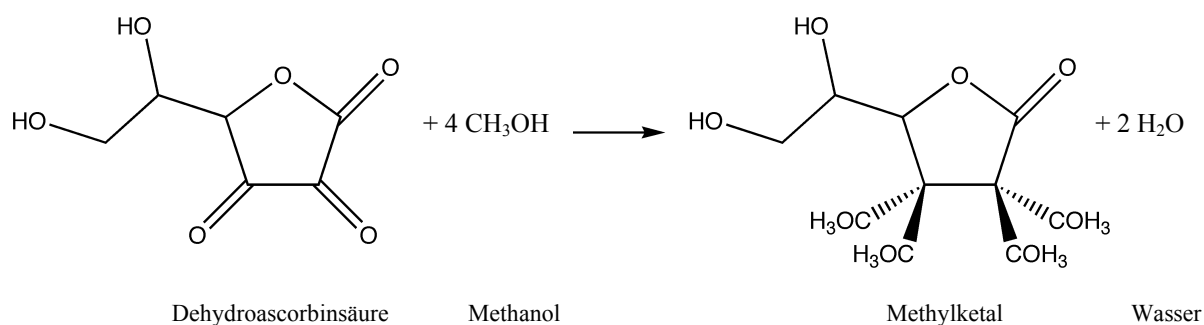


Abb. 4 Die Reaktion zwischen Methanol und Dehydroascorbinsäure.

Die Reaktion zwischen Methanol und Dehydroascorbinsäure liefert verschiedene Produkte. Das Hauptprodukt wurde durch massenspektroskopische Analyse [20] identifiziert und ist oben dargestellt.

Die Absorptionsänderung bei 346 nm während der Inkubation von Dehydroascorbinsäure mit Methanol in Phosphat/Citrat-Puffer bei 37° C erfolgt stereotyp (Abb.5/a). Nach einer kurzen Eingangsphase bleibt die Geschwindigkeit der Absorptionsänderung gleich, so dass die Absorption linear ansteigt. Später nimmt die Geschwindigkeit der Absorptionssteigerung ab, um schließlich auf ein asymptotisches Plateau zu führen [20]. Die Absorptionswerte auf diesem asymptotischen Plateau zu gegebenen Zeitpunkten, z.B. 30 Minuten nach Reaktionsbeginn, korrespondieren linear mit der Ausgangskonzentration von Dehydroascorbinsäure und können darum zur quantitativen Analyse genutzt werden (Abb. 5/b).

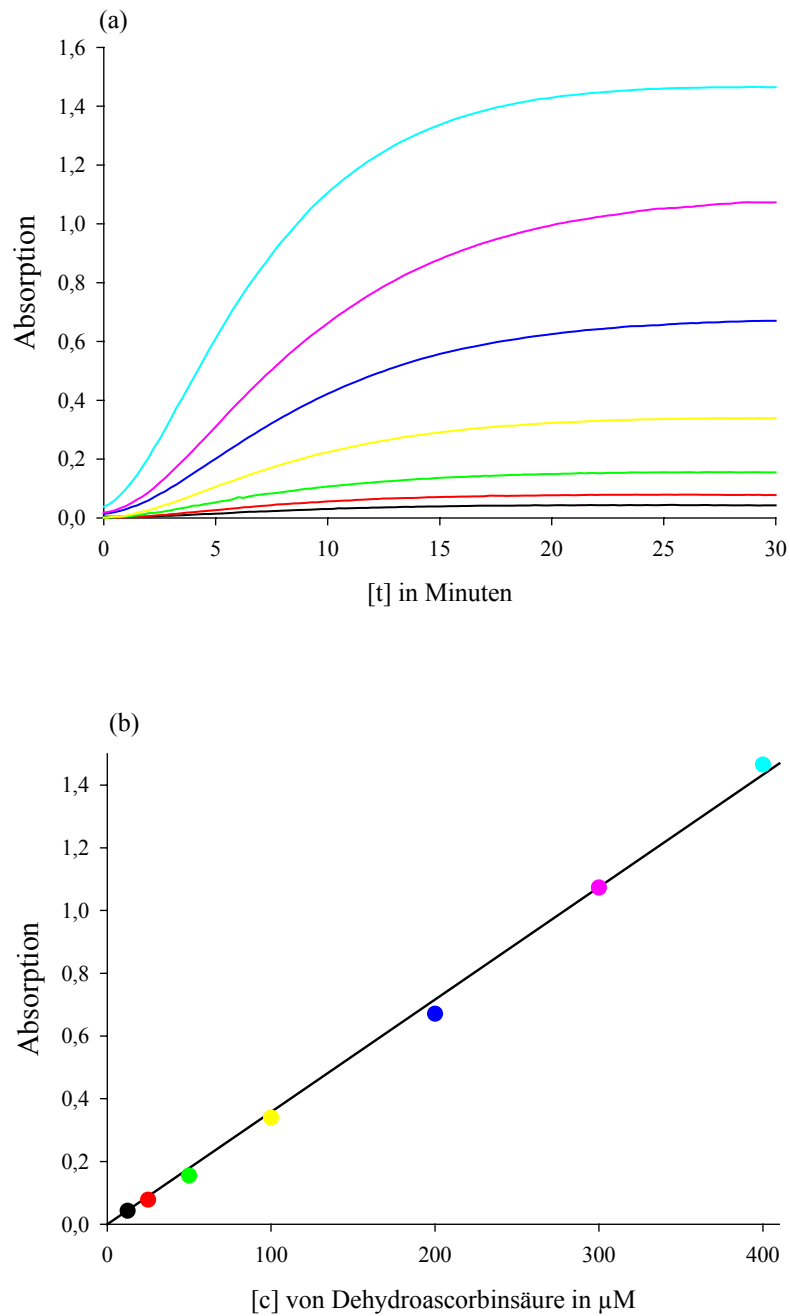


Abb. 5 Absorptionsänderung bei 346 nm während Inkubation von DHA und Methanol. Dehydroascorbinsäure (DHA) wurde in Konzentrationen von 12,5 μM bis 400 μM in Wasser gelöst. Ein Aliquot von 100 μl wurde in 2,9 ml Methanol haltigem Phosphat/Citrat-Puffer bei 37°C inkubiert. Der Absorptionsanstieg bei 346 nm durch die Bildung des Chromophors wurde alle 25 Sekunden gemessen (a). Die Absorptionswerte nach einer Inkubationsperiode von 30 Minuten wurden in Relation zur Ausgangskonzentration gesetzt (b). Die Daten zeigten eine lineare Korrelation zwischen der Konzentration von Dehydroascorbinsäure und der Absorption bei 346 nm ($r^2 > 0,9993$), (repräsentative Darstellung aus vier Experimenten).

Die Inkubationszeit von 30 Minuten kann bei Bedarf auch verlängert werden, z.B. wenn eine große Zahl von Proben bearbeitet werden soll. Die quantitative Analyse der Dehydroascorbinsäure gelingt mit hoher Validität auch nach längeren Inkubationsperioden (Abb. 6).

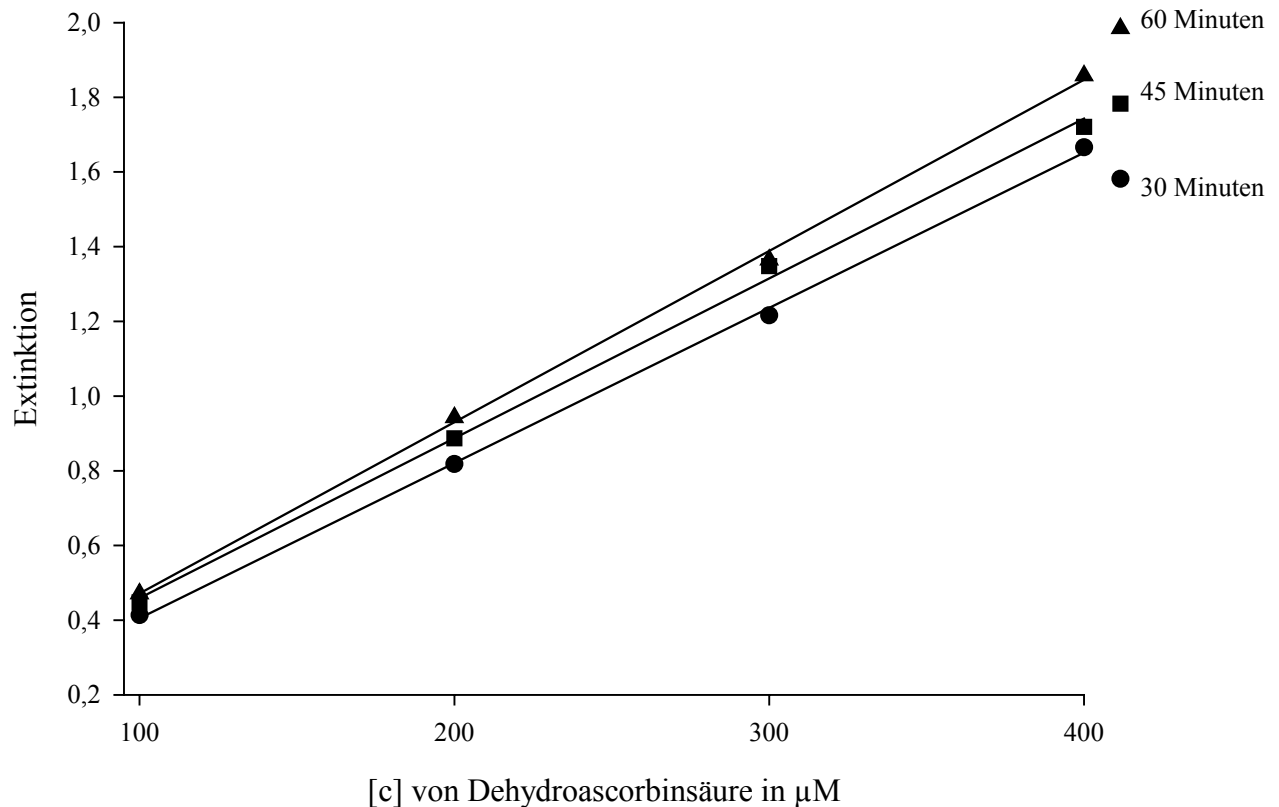


Abb. 6 Inkubation von Dehydroascorbinsäure über verschiedene Inkubationsperioden. Dehydroascorbinsäure wurde in Konzentrationen von 50 – 400 µM in Wasser gelöst. Diese Lösungen wurden in drei Serien geteilt und mit Methanol in Phosphat/Citrat-Puffer für 30, 45 und 60 Minuten inkubiert. Nach Ende des jeweiligen Inkubationszeitraumes wurde die Extinktion bei 346 nm gemessen und gegen die Dehydroascorbinsäure-Konzentration aufgetragen. Die Korrelation aller drei Messserien war hoch ($r^2 > 0,99$), (repräsentative Darstellung aus drei Experimenten).

Um die quantitative Analyse der Dehydroascorbinsäure in biologischen Proben weiter zu verbessern, wurde entsprechend 2.1.1 jeder Probe ein individueller Leerwert zugeordnet, der sich nur durch die Anwesenheit von 1,4-Dithio-DL-threitol unterschied. Dieser Zusatz interferierte nicht mit der spektrophotometrischen Messung bei 346 nm und die Korrelation der einzelnen Messwerte blieb unbenommen hoch ($r^2 > 0,999$), wodurch eine große Validität der Methode für den Nachweis von Dehydroascorbinsäure gegeben ist (Abb. 7). Die Verwendung von 1,4-Dithio-DL-threitol zur Reduktion von Dehydroascorbinsäure zu

Ascorbinsäure in biologischen Proben wurde bereits beschrieben, so dass eine Bestimmung von Dehydroascorbinsäure in Zellkulturproben ebenfalls möglich ist. Alternativ kann das Enzym Dehydroascorbat-Reduktase (EC 1.8.5.1) anstelle des 1,4-Dithio-DL-threitol zur hochspezifischen Reduktion von Dehydroascorbinsäure benutzt werden [15,17,60,70]. Obwohl dieses Enzym bereits aus tierischen und pflanzlichen Organismen isoliert wurde, ist es kommerziell noch nicht erhältlich und muss vor jeder Anwendung isoliert werden [16,18,19].

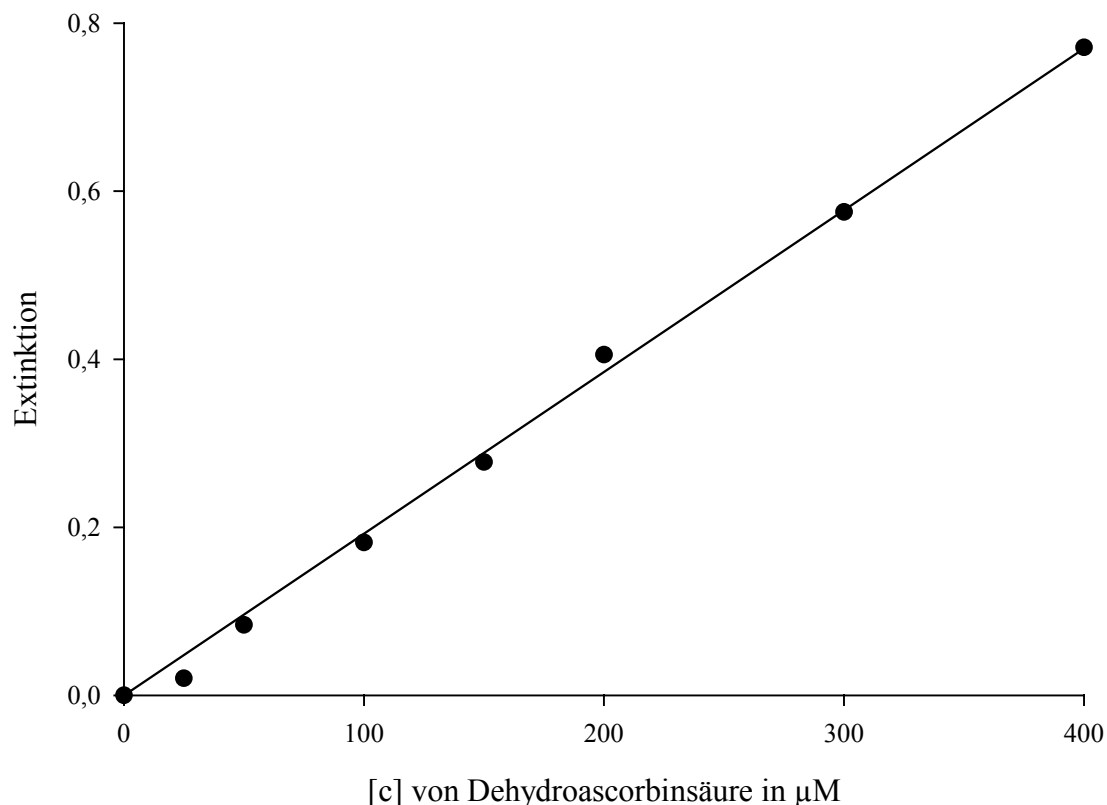


Abb. 7 Quantitativer Nachweis der Dehydroascorbinsäure unter Verwendung von 1,4-Dithio-DL-threitol und individuellem Leerwert.

Dehydroascorbinsäure wurde in Konzentrationen von 0 – 400 µM in Aqua bidest. gelöst. Ein Aliquot von 200 µl wurde entsprechend 2.2.1 behandelt. Die Messpunkte korrespondierten mit hoher Korrelation ($r^2 > 0,999$), (repräsentative Darstellung aus drei Experimenten).

3.1.2 Kalibrierung mit Ascorbinsäure

Aus der Oxidation von Ascorbinsäure durch das Enzym Ascorbat-Oxidase geht eine äquivalente Menge an Dehydroascorbinsäure hervor. Diese kann durch die Reaktion mit Methanol in Phosphate/Citrat-Puffer in ein spektrophotometrisch quantifizierbares Chromophor umgewandelt werden. Die Anwesenheit von meta-Phosphorsäure und KOH

während der Kalibrierung beeinträchtigten die Validität nicht (Abb. 8), sondern verbessert die Haltbarkeit der Ascorbinsäureproben und erleichtert die Einstellung eines optimalen pH-Bereichs für die durch die Ascorbat-Oxidase katalysierte Reaktion [37].

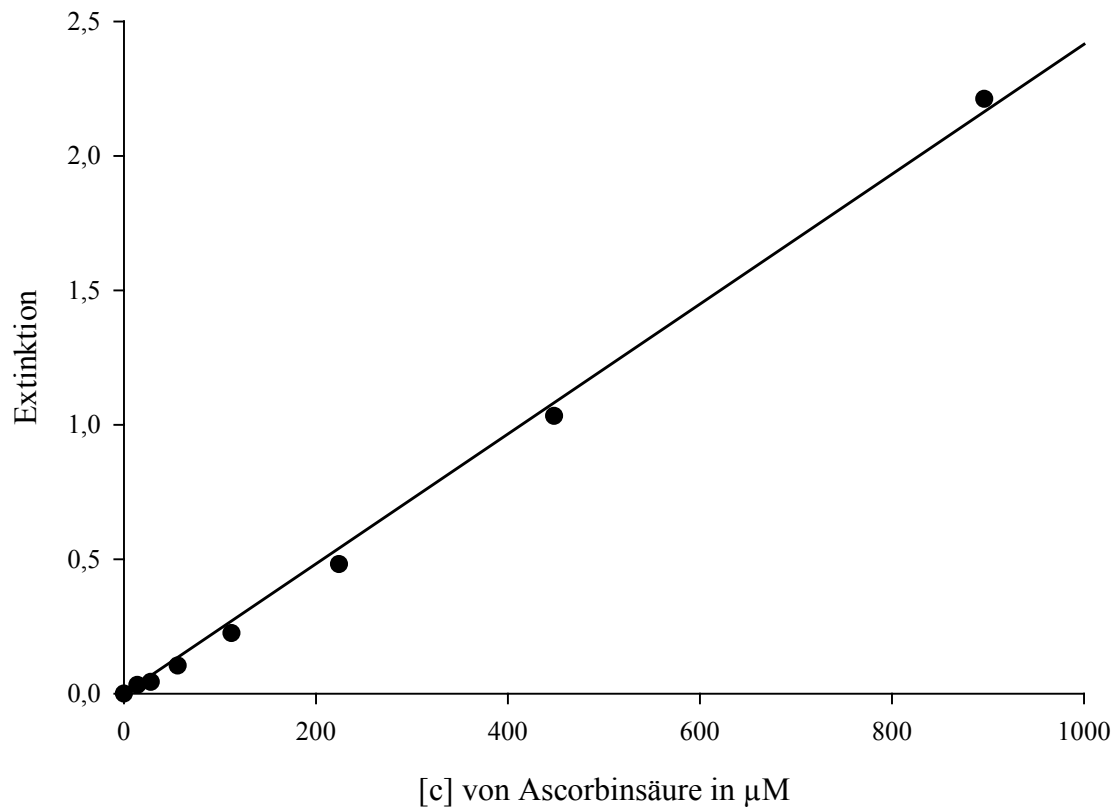


Abb. 8 Kalibrierung mit Ascorbinsäure bei Einzelpunktmessung und Leerwertbestimmung.

Ascorbinsäure wurde in Konzentrationen von 0 – 8 mM in Aqua bidest. gelöst. Ein Aliquot von 20 µl wurde mit 160 µl 8% meta-Phosphorsäure versetzt. Die nachfolgenden Schritte erfolgten entsprechend 2.2.3. Die Korrelation zwischen den Messwerten war hoch ($r^2 > 0,999$), (repräsentative Darstellung aus über 10 Experimenten).

Die Anwesenheit anderer Säuren beeinflusst den Nachweis des Chromophors negativ [37]. Tatsächlich war in Anwesenheit von Trichlor-Essigsäure der Nachweis von Ascorbinsäure nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

3.1.3. Nachweis von Ascorbinsäure mit der Methanolmethode im Vergleich zur Quantifizierung durch Kapillarelektrophorese

Sowohl die mittels Kapillarelektrophorese, als auch die mit der Methanolmethode erstellte Eichreihe zeigten eine hohe Korrelation zwischen den Werten. Die Wiederbestimmung eingesetzter Mengen von Vitamin C gelang mit beiden Verfahren problemlos und mit hoher Korrelation ($r^2 > 0,99$ in beiden Fällen) (Abb. 9).

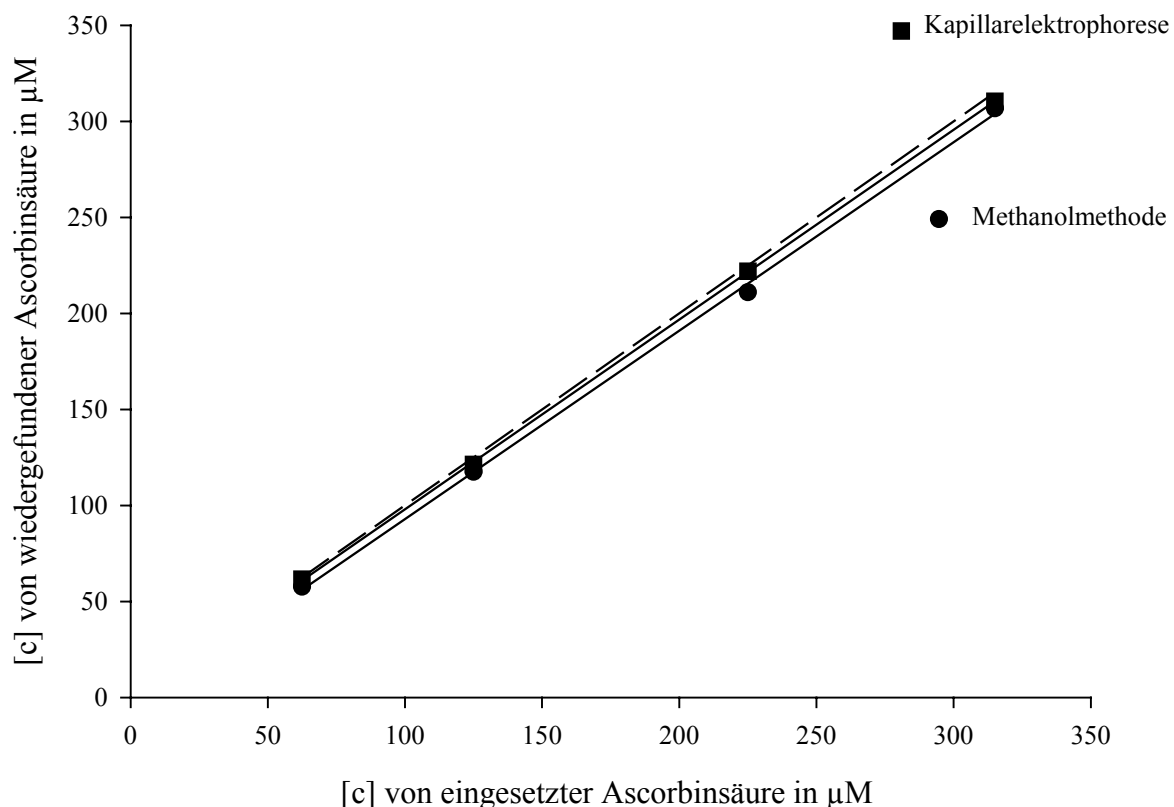


Abb. 9 Vergleich zwischen der Methanolmethode und kapillarelektrophoretischer Auftrennung.

Ascorbinsäure wurde in Konzentrationen von 0, 25, 50, 100, 200 und 400 µM in Aqua bidest. gelöst. Zum Vergleich der Nachweisfähigkeit von Ascorbinsäure zwischen der spektrophotometrischen Methanolmethode und der Kapillarelektrophorese, wurden beide Systeme jeweils mit den gleichen Standardlösungen geeicht. Danach wurden die Konzentrationen von Ascorbinsäurelösungen der Konzentrationen 62,5 µM, 125 µM, 225 µM und 315 µM sowohl mit der Kapillarelektrophorese, als auch mit der Methanolmethode bestimmt. Schließlich wurden diese Ergebnisse gegeneinander aufgetragen. Die eingezeichnete unterbrochene Linie markiert eine ideale Steigungsgerade mit der Steigung 1, (repräsentative Darstellung aus vier Experimenten).

3.1.4 Ascorbinsäure in Zellkulturproben

Es wurde bereits publiziert, dass in immortalisierten Zellkulturen Ascorbinsäure nicht nachweisbar ist [26,52]. In Einklang mit diesen Befunden konnte auch in unbehandelten Kulturen von L929 Mausfibroblasten keine Ascorbinsäure detektiert werden. Darum war zur Steigerung der intrazellulären Ascorbinsäurespiegel auf ein nachweisbares Niveau eine Beladung der Zellen mit Ascorbinsäure notwendig, ohne jedoch die zytotoxische Schwelle zu überschreiten [27].

Ascorbinsäurekonzentrationen bis 1 mM bewirken keinen Verlust der Vitalität bei L929-Zellen, wie anhand der Freisetzung von LDH bestimmt werden konnte (Abb. 10). Allerdings wurde die Ascorbinsäurekonzentration im folgenden Experiment auf 400 μM begrenzt, um Zellschädigung durch Ascorbinsäure auszuschließen.

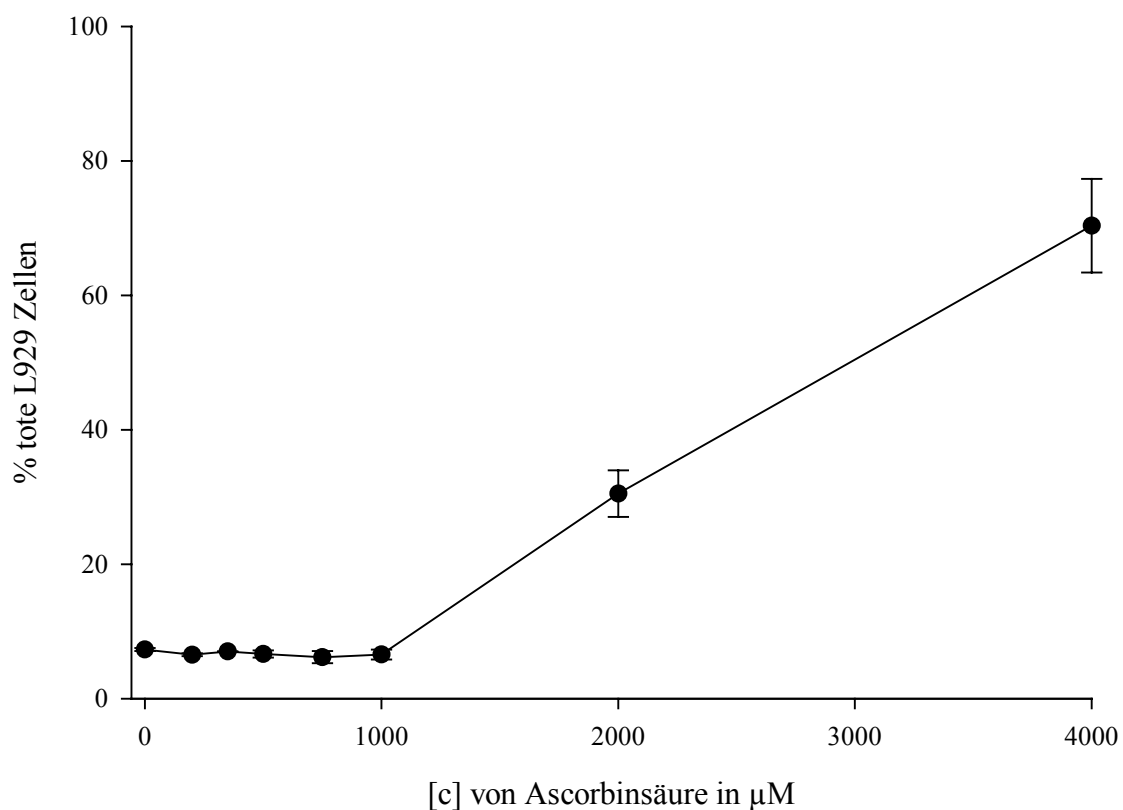


Abb. 10 Zellschädigung von L929-Zellen durch Ascorbinsäure.

L929 Zellen wurden über 24 Stunden in MEM inkubiert, dem 0-4000 μM Ascorbinsäure zugesetzt worden war. Am Folgetag wurde das Ausmaß der Zellschädigung anhand der LDH-Freisetzung entsprechend 2.2.9 quantifiziert, (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier Experimenten mit Doppelbestimmung, in einigen Fällen wird die Standardabweichung durch das Mittelwertsymbol verdeckt).

Da die Aufnahme von Ascorbinsäure aus dem Medium durch Zellmembrantransporter vermittelt wird, differieren die intrazellulär angereicherten Mengen an Ascorbinsäure zelltypspezifisch [2,10].

L929 Zellen zeigten eine dosisabhängige intrazelluläre Ascorbinsäure-Akkumulation (Abb. 11). Bei einer Konzentration von 400 μM Ascorbinsäure im Medium strebte die intrazellulär akkumulierte Menge an Ascorbinsäure asymptotisch gegen $40,8 \pm 6,2$ nmol Ascorbinsäure / mg Protein. Diese Befunde stimmen mit den Daten von Huang *et al.* [27] überein, die die intrazellulären Ascorbinsäurespiegel chromatographisch mit einer HPLC-Analyse bestimmten.

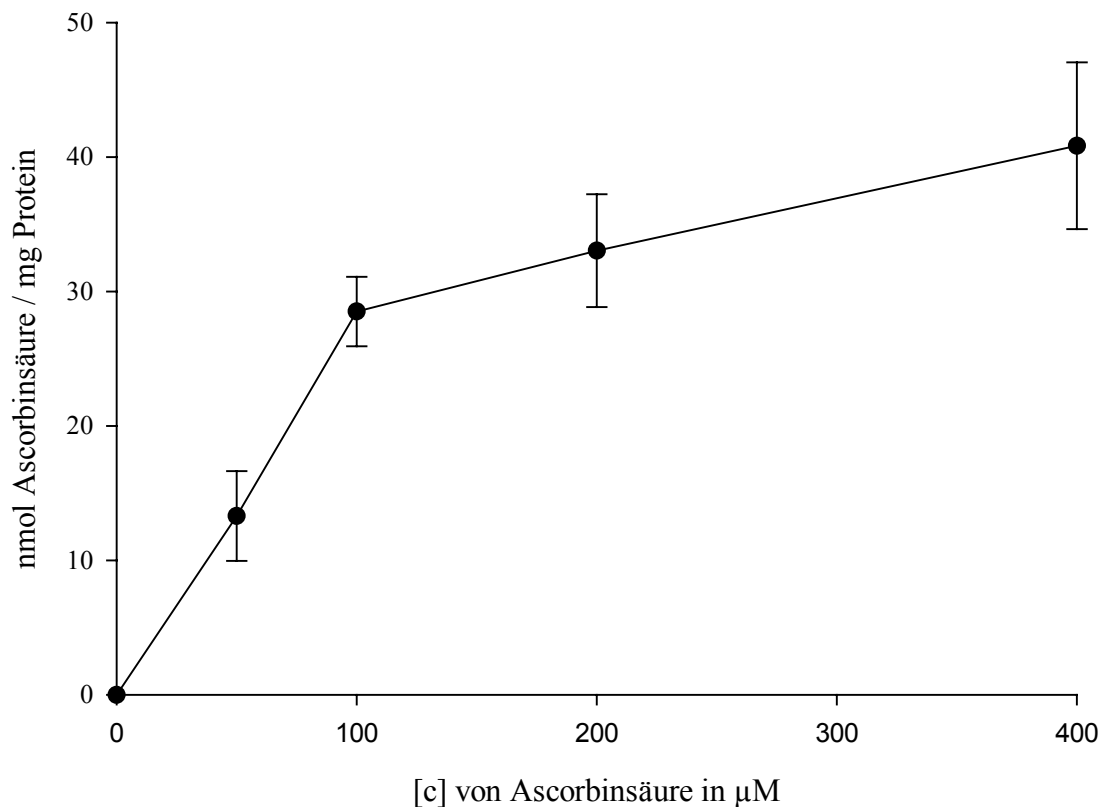


Abb. 11 Abhängigkeit der intrazellulären Ascorbinsäurekonzentration in L929 Maus-fibroblasten von der extrazellulären Konzentration des Vitamins in MEM.

Ascorbinsäure wurde MEM als Bolus zugefügt, um Konzentrationen zwischen 0 und 400 μM zu erreichen. Die Zellen wurde über 24 Stunden in MEM mit Ascorbinsäure als Additiv inkubiert und anschließend lysiert. Die Menge an intrazellulärer Ascorbinsäure wurde quantifiziert und als nmol Ascorbinsäure / mg Zellprotein wiedergegeben, (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier Experimenten mit Doppelbestimmung).

Nach Substitution des mit Ascorbinsäure angereicherten MEMs durch eine modifizierte HBSS ohne Ascorbinsäure konnten die Zellen in Abwesenheit von Glucose über mindestens vier Stunden die intrazellulären Ascorbinsäurespiegel aufrecht erhalten (Abb. 12). Waren in der modifizierten HBSS hingegen 10 mM Glucose gelöst, so kam es zu keiner signifikanten Abnahme der intrazellulären Ascorbinsäure-Konzentration.

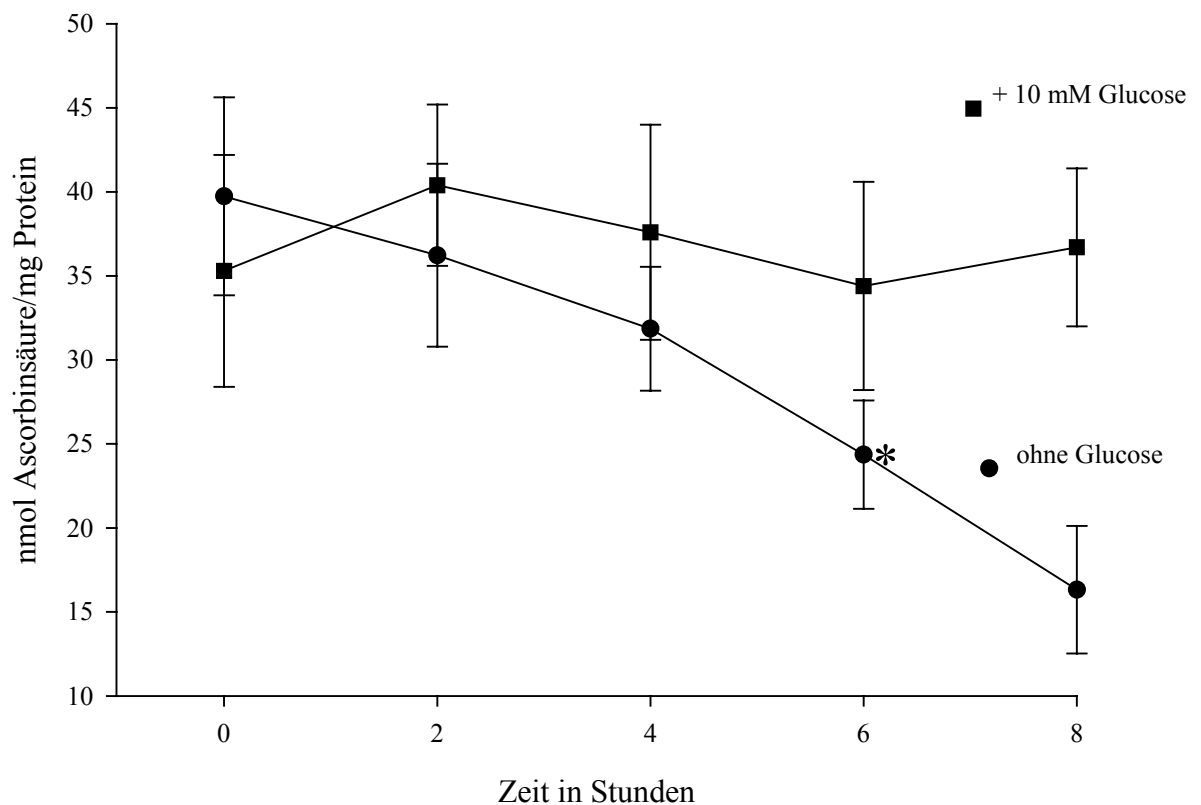


Abb. 12 Stabilität von Ascorbinsäure in L929 Zellen.

L929 Zellen wurde für 24 Stunden in MEM mit 200 μ M Ascorbinsäure inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurde das Zellkulturmedium durch modifizierten HBSS \pm 10 mM Glucose ersetzt. Der Gehalt von intrazellulärer Ascorbinsäure wurde an ausgewählten Zeitpunkten bestimmt, (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Experimenten mit Doppelbestimmung).

3.1.5 Bestimmung von Ascorbinsäure in Blutserum

Neben der Bestimmung von Vitamin C in Zellkulturproben ist die Detektion dieses Vitamins in anderen biologischen Proben von großem Interesse. Die Bestimmung von Ascorbinsäure mit der Methanolmethode gelingt ebenfalls in Blutserumproben.

Die initiale Konzentration von Ascorbinsäure in den Serumproben der Mitglieder unserer Arbeitsgruppen lag zwischen 46 μM und 97 μM . Es zeigte sich eine Abhängigkeit von der Ernährung der Probanden (Daten nicht gezeigt), welche in Einklang mit vorherigen Bestimmungen zu bringen ist [25,29,71].

Nach Entfernung des endogenen Ascorbinsäuregehaltes durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wurden die Proben mit verschiedenen Konzentrationen exogener Ascorbinsäure supplementiert, um das Verhältnis von zugefügter zu wiedergefundener Ascorbinsäure zu quantifizieren.

In allen Ansätzen zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen zugefügter und wiedergefundener Ascorbinsäure ($r^2 > 0,996$) und die Steigung der resultierenden Regressionsgeraden beträgt 1,004 (Abb. 13).

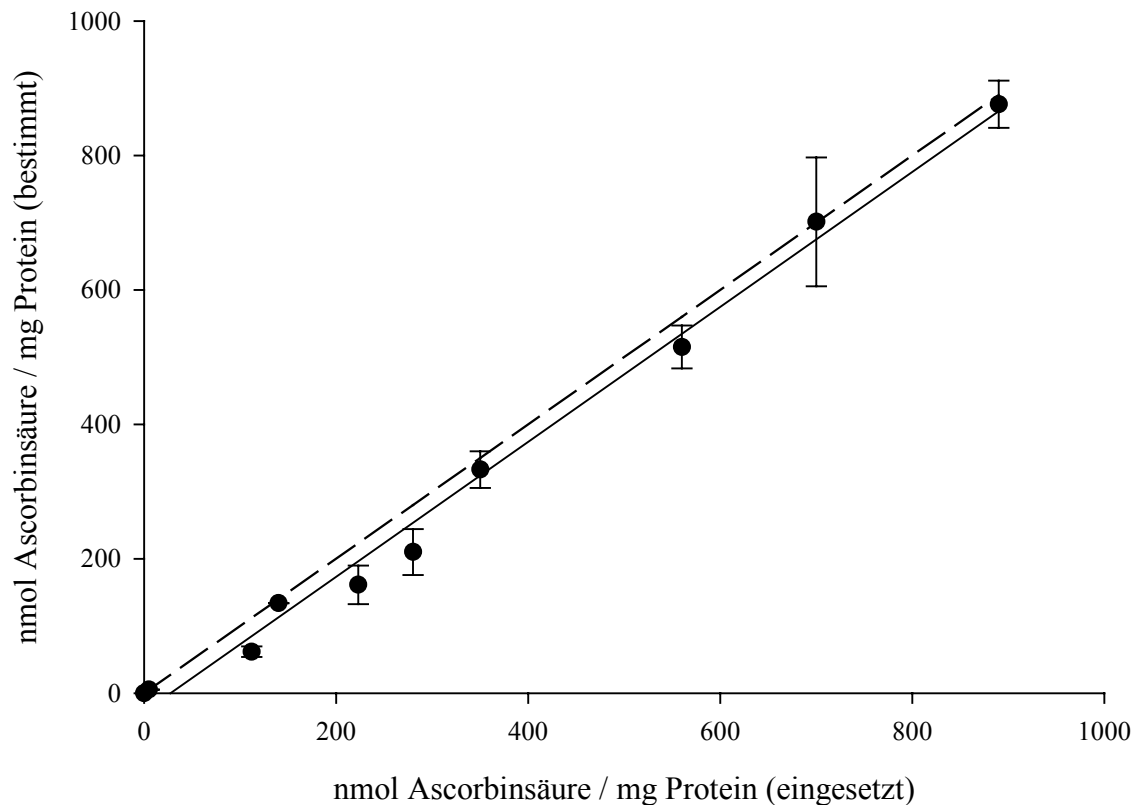


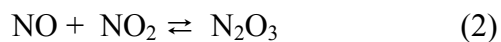
Abb. 13 Bestimmung von Ascorbinsäure in Blutserum.

Ascorbinsäure wurde in Konzentrationen von 0 – 890 μM in Blutserum gelöst. Die Konzentration von Ascorbinsäure wurde wie unter 2.2.4 beschrieben quantifiziert. Die Abbildung setzt die Menge an zugesetzter Ascorbinsäure zur Menge an detektierter Ascorbinsäure in Beziehung. Die Korrelation zwischen den Wertepaaren ist $r^2 > 0,996$, die Steigung der entsprechenden Regressionsgeraden ist 1,004. Die eingezeichnete unterbrochene Linie markiert eine ideale Steigungsgerade mit der Steigung 1, (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier Experimenten mit Doppelbestimmung).

Zusammenfassend zeigt sich hier die Überlegenheit der Methanol-Methode gegenüber den bereits etablierten Testverfahren. Die Entwicklung dieses effektiven Analyseverfahrens bildete die Grundlage für die folgenden Untersuchungen zur Wirkung von N_2O_3 im Zytosol der L929-Zellen.

3.2 Messung der intrazellulären Nitrosierung von DAF-2 auf Einzelzellebene

Extrazellulär gebildetes bzw. freigesetztes NO permeiert die Zellmembran und ist intrazellulär der Reaktionskette



unterworfen.

Das intrazellulär gebildete N_2O_3 kann, wie in der Einleitung erwähnt, eine der primären Aminogruppen des 4,5-Diaminofluoresceins nitrosieren. Bei dieser Reaktion entsteht die chromophore Gruppe, so dass der Anstieg der Fluoreszenz (entsprechend der DAF-2T-Bildung) die Menge an aktivem N_2O_3 widerspiegelt (Abb. 2). Die zelluläre DAF-2T-Fluoreszenz wurde mit einem Videomikroskop detektiert. Mit einem Bearbeitungsprogramm konnten die digitalisierten Fluoreszenzintensitäten ausgewertet werden. Das Programm erlaubt eine örtliche und zeitliche Lokalisation der Fluoreszenzintensitäten, so dass einzelne Zellen analysiert werden konnten (Abb.14).

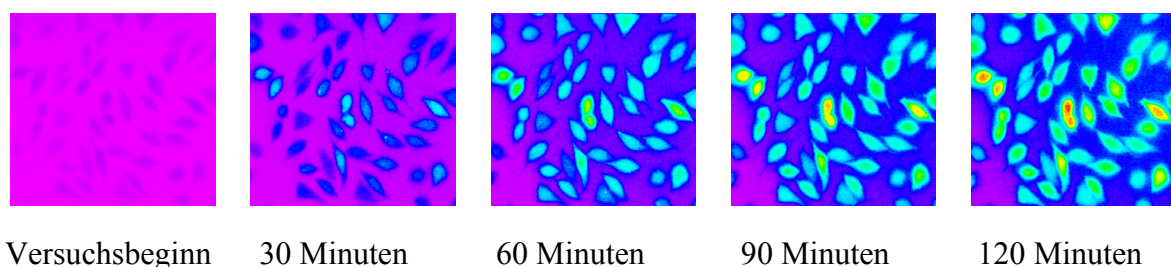


Abb. 14 Videomikroskopische Messung der intrazellulären Nitrosierung von DAF-2 durch N_2O_3 auf Einzelzellebene.

L929 Mäusfibroblasten wurden in modifiziertem HBSS unter Einwirkung von $250 \mu\text{M}$ Spermin-NONO über zwei Stunden, bzw. mit $1,6 \text{ mM}$ Nitroprussidnatrium über 30 Minuten inkubiert. Die Fluoreszenzwerte wurden mit einem Videomikroskop detektiert und über ein Bearbeitungsprogramm konnten die digitalisierten Fluoreszenzintensitäten ausgewertet werden. Das Programm erlaubte eine örtlich und zeitliche Lokalisation der Fluoreszenzintensitäten, wodurch einzelne Zellen analysiert werden können. Beispielhaft ist hier eine Messreihe mit Spermin-NONO dargestellt.

Als NO-Donatoren wurden Nitroprussidnatrium und Spermin-NONO gewählt. Extrazellulär hinzugegeben setzen diese Verbindungen NO frei, welches die Zellmembran nach intrazellulär permeieren kann, wo entsprechend der o.g. Reaktionsgleichung in Gegenwart von Sauerstoff N_2O_3 entsteht, dass in der Lage ist, intrazelluläres DAF-2 zu nitrosieren.

3.2.1 Intrazelluläre Bildung von N_2O_3 durch NO-Freisetzung aus Nitroprussidnatrium

Nitroprussidnatrium ist ein Nitrosometallkomplex, der in Gegenwart von Thiolgruppen (RSH) (Abb. 15) ohne enzymatische Katalyse spontan NO freisetzt, es kommt hierbei zu einem Anstieg der Extinktion bei 395 nm [72]:

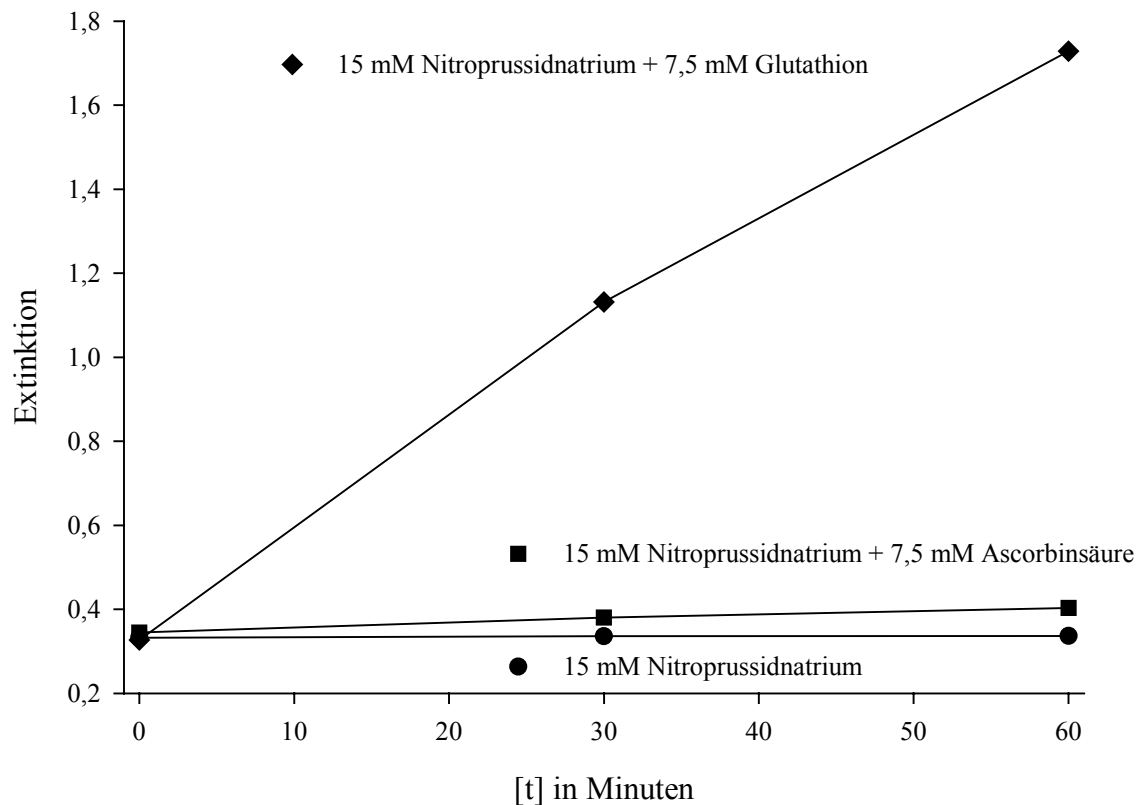
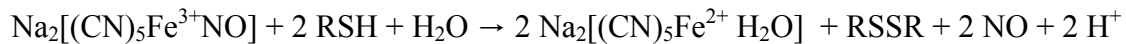


Abb. 15 Zerfall von Nitroprussidnatrium in Abhängigkeit von Licht und Antioxidantien.

15 mM Nitroprussidnatrium wurden unter ständiger Durchmischung bei 37°C inkubiert. Die Extinktion bei 395 nm wurde zu den Zeitpunkten 0, 30 und 60 Minuten bestimmt. Im Ansatz ohne weitere Additive kam es zu keiner relevanten Steigerung der Extinktion (+1,2%). Die Gegenwart von 7,5 mM Ascorbinsäure steigerte die Extinktion über den Beobachtungszeitraum um 17%. 7,5 mM Glutathion bewirkten einen Anstieg der Extinktion nach 3600 Sekunden um 429%, (repräsentative Darstellung aus vier Experimenten).

Der Freisetzung von NO aus Nitroprussidnatrium erfolgt entsprechend:



Ebenfalls kann NO aus Nitroprussidnatrium durch die Einwirkung von Licht kurzer Wellenlängen, nicht jedoch durch sichtbares Licht, freigesetzt werden. Hierbei steht die Menge an gebildetem NO und dem toxischen Zerfallsnebenprodukt Cyanid im stöchiometrischen Verhältnis zur Menge einwirkender Lichtquanten [72]. Aus diesem Grund eignet sich Nitroprussidnatrium zur kontrollierten Freisetzung von klar durch die Lichtmenge definierten Mengen an NO. Wird NO auf diese Art extrazellulär gebildet, permeiert es die Zellmembran und es entsteht in Gegenwart von Sauerstoff entsprechend der unter 3.2 genannten Reaktionsgleichung N_2O_3 , welches intrazellulär mittels der Nitrosierungsreaktion von N_2O_3 an DAF-2 analog zur Abb. 2 fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzelebene quantifiziert werden kann.

Bei der durch Cystein vermittelten Freisetzung von NO aus Nitroprussidnatrium in Gegenwart mit DAF-2 angereicherten L929 Mäusfibroblasten kam es zu einem, dem kumulativen Lichteinfall proportionalen Anstieg der Fluoreszenz (Abb. 16).

Dieser Anstieg der Fluoreszenz und somit die intrazelluläre Nitrosierung von DAF-2 durch N_2O_3 konnte durch eine vorherige Inkubation mit 200 μM Ascorbinsäure über 24 Stunden signifikant reduziert werden. Jedoch kam es recht schnell zu einer Cyanid bedingten Zellschädigung, die eine Begrenzung des Beobachtungszeitraums auf 30 Minuten nötig machte, da in deren Rahmen zytoprotektive Effekte maskiert wurden. Aus diesem Grund wurden die weiteren Versuche mit Spermin-NONO durchgeführt, da dessen zytotoxisches Potential weitaus geringer ausgebildet ist und darum Beobachtungszeiträume von 120 Minuten möglich waren.

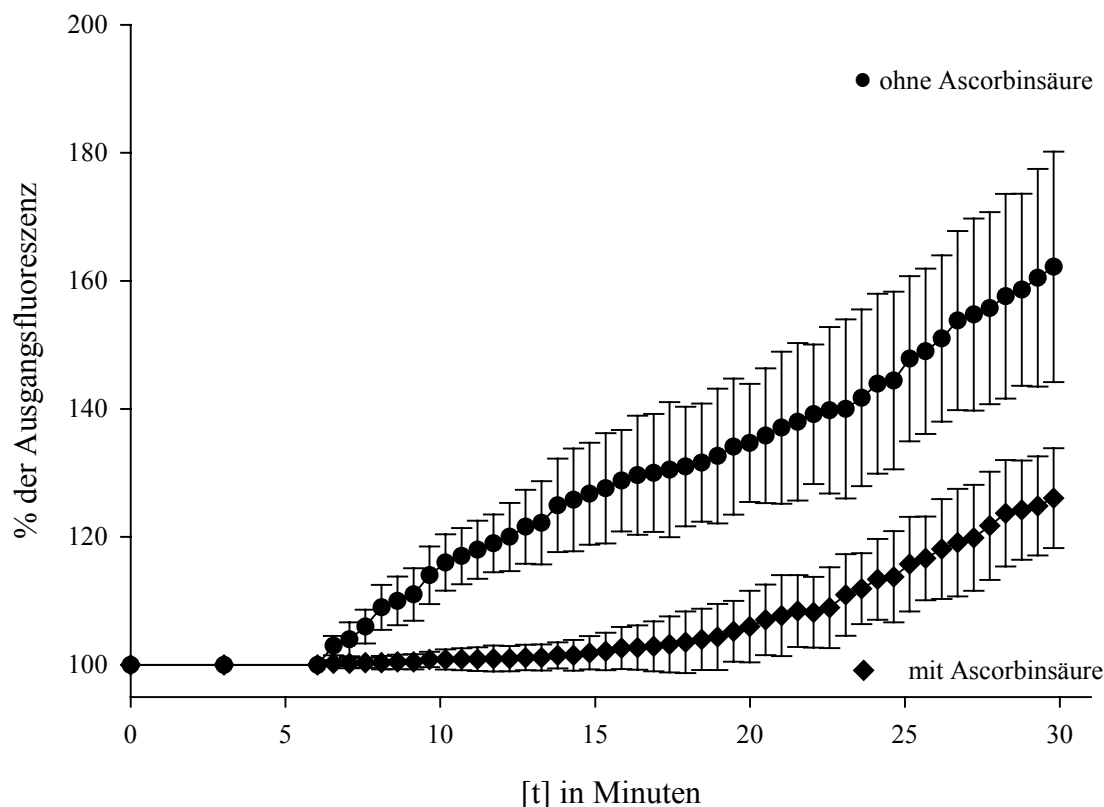


Abb. 16 Intrazelluläre Nitrosierung von DAF-2 durch aus Nitroprussidnatrium freigesetztem NO.

DAF-2 angereicherte Zellen wurden für 30 Minuten mit 1,6 mM Nitroprussidnatrium und 10 mM L-Cystein inkubiert. Die Basisfluoreszenz wurde 3 und 6 Minuten nach Versuchsbeginn detektiert. Nachfolgend wurde alle 30 Sekunden durch Bestrahlung für 1 Sekunde eine NO-Freisetzung aus Nitroprussidnatrium induziert und die Fluoreszenz bestimmt, (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier Experimenten, in einigen Fällen wird die Standardabweichung vom Mittelwertsymbol verdeckt).

3.2.2 Intrazelluläre Nitrosierung von DAF-2 durch N_2O_3 über die Freisetzung von NO aus Spermin-NONO

Extrazellulär hinzugegebenes Spermin-NONO zerfällt in modifizierter HBSS bei 37° C und einem physiologischen pH Wert zu einem Molekül Spermin und zwei Molekülen NO [31]. Die Halbwertszeit dieser Reaktion erster Ordnung beträgt 40 Minuten. Das freigesetzte NO permeiert die Zellmembran und es entsteht entsprechend 3.2 intrazelluläres N_2O_3 , welches die sekundäre Aminogruppe des 4,5-Diaminofluoresceins nitrosieren und somit die Bildung der chromophoren Gruppe induzieren kann (Abb. 2).

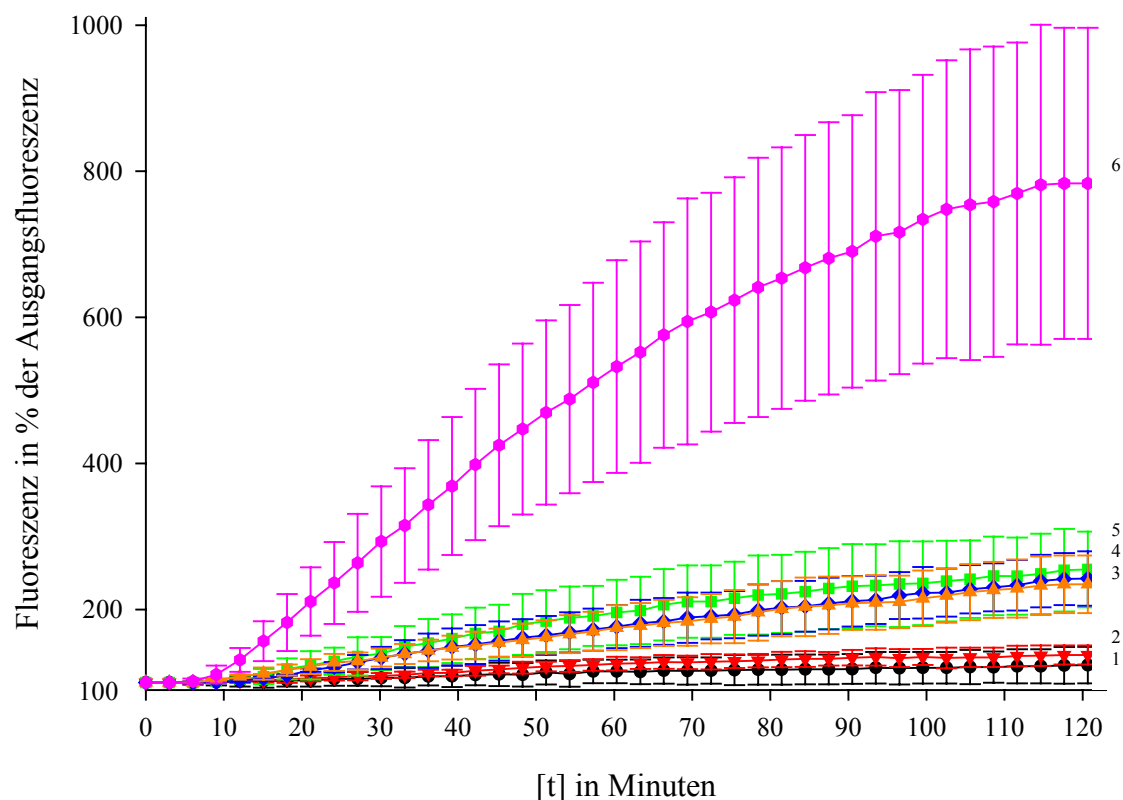
Beim Vergleich des Anstiegs der Fluoreszenz von DAF-2 demarkieren sich drei Gruppen (Abb. 17):

1) *Kontrollgruppe*. Die Fluoreszenz der Zellkulturansätze, die mit DAF-2 vorinkubiert und anschließend ohne weitere Behandlung 250 μ M Spermin-NONO ausgesetzt wurden, stieg im Mittel auf das achtfache der Ausgangsfluoreszenz an.

2) *Ansätze mit Ascorbinsäure **oder** Glucose*. Durch 24-stündige Vorinkubation mit 200 μ M Ascorbinsäure oder dem alternativen Zufügen von 10 mM Glucose ließ sich dieser Anstieg der Fluoreszenz deutlich verhindern. Die Fluoreszenz dieser Zellkulturansätze stieg im Mittel nur noch auf das doppelte der Ausgangsfluoreszenz an. Die 24-stündige Vorinkubation mit 200 μ M BSO, und damit die Hemmung der Reduktion von Glutathion, zeigte keine signifikante Auswirkung auf die Wirkung der Glucose.

3) *Ansätze mit Ascorbinsäure **und** Glucose*. Die maximale Reduzierung der intrazellulären Nitrosierung ließ sich durch vorherige Inkubation mit 200 μ M Ascorbinsäure und Zugabe von 10 mM Glucose erreichen. Hier stieg die Fluoreszenz im Mittel nur um 17 % an. Auch hier bewirkte eine 24-stündige Vorinkubation mit 200 μ M BSO keine relevante Änderung des Effektes.

Zusammenfassend zeigt sich hier, dass das Ausmaß des protektiven Effektes von Ascorbinsäure nicht an die Höhe des Glutathion-Spiegels gebunden ist, da der protektive Effekt von Ascorbinsäure, bzw. Glucose, alleine in L929-Zellen sowie deren synergistischer Effekt durch die BSO-bedingte Hemmung der Glutathion-Reduktase nicht beeinflusst werden.



Ansatz	Zusätze	prozentualer Anstieg
1	Ascorbinsäure und Glukose	124 % ± 25
2	Ascorbisäure, Glukose und BSO	138 % ± 13
3	Ascorbinsäure	255 % ± 52
4	Glukose	243 % ± 37
5	Glukose und BSO	234 % ± 39
6	Kontrollgruppe (keine Zusätze)	783 % ± 213

Abb. 17 Intrazelluläre Nitrosierung von DAF-2 durch aus Spermin-NONO generiertem N_2O_3 .

L929 Zellen wurde nach eventueller Vorkinkubation mit 200 μ M Ascorbinsäure oder 200 μ M BSO für 24 Stunden bei 5% CO_2 und 37° C für zwei Stunden mit 2 μ M DAF-2 vorinkubiert. Hernach wurde zunächst die basale Fluoreszenz der Zellen bei den Zeitpunkten 0, 3 und 6 Minuten bestimmt. Anschließend wurde nach Zugabe von 250 μ M Spermin-NONO in modifizierte HBSS die Fluoreszenz alle 3 Minuten für einen Gesamtzeitraum von 120 Minuten bestimmt. In Abhängigkeit von der Fragestellung wurden die Experimente in An- oder Abwesenheit von 10 mM Glukose durchgeführt. Der prozentuale Anstieg der mittleren Fluoreszenz wurde aus den Mittelwerten von Experimenten gleicher Bedingungen ermittelt. (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus fünf Experimenten).

3.3 Einfluss von Glukose auf die intrazelluläre Ascorbinsäurekonzentration in L929-Zellen unter der Inkubation mit Spermin-NONO

In unbehandelten L929-Mausfibroblasten, wie in anderen immortalisierten Zellkulturlinien [26,52], kann weder Ascorbin- noch Dehydroascorbinsäure nachgewiesen werden (siehe Seite 3.1.4). Darum wurde zur Steigerung der intrazellulären Ascorbinsäurespiegel die L929-Mausfibroblasten mit Ascorbinsäure beladen wie unter 2.2.6 angeführt.

Nach 24-stündiger Beladung mit 200 μ M Ascorbinsäure akkumulierten L929-Zellen im Mittel 35 nmol Ascorbinsäure / mg Protein. Unter dem Einfluss von 1 mM Spermin-NONO ist in Abwesenheit von Glukose nach einer Halbwertszeit von Spermin-NONO (40 Minuten) intrazellulär keine Ascorbinsäure mehr nachweisbar (Abb. 18). Liegen im Reaktionspuffer hingegen 10 mM Glukose vor, fällt die intrazelluläre Ascorbinsäurekonzentration zwar zügig ab, bleibt aber dann auf einem Niveau von 10 nmol / mg Protein erhalten.

Demzufolge sind es Glukose-abhängige Metaboliten, die Ascorbinsäure bei erhöhtem Verbrauch intrazellulär regenerieren und die intrazellulären Spiegel oberhalb der Nachweisgrenze von 0,1 nmol Ascorbinsäure / mg Protein stabilisieren. Diese verbliebenen Mengen an Ascorbinsäure stehen zur direkten Reaktion mit N_2O_3 zur Verfügung.

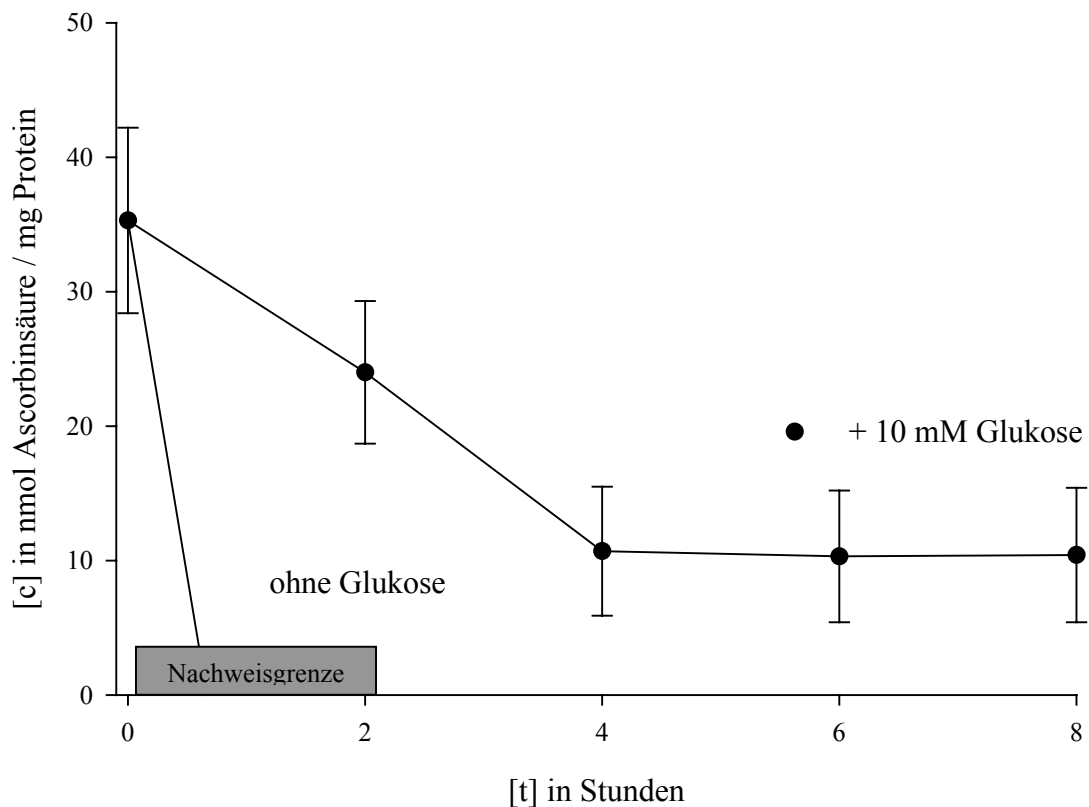


Abb. 18 Einfluss von Glukose auf die intrazelluläre Ascorbinsäurekonzentration in L929-Zellen unter der Inkubation mit Spermin-NONO.

L929 Mausfibroblasten wurden über 24 Stunden mit 200 μ M Ascorbinsäure in MEM inkubiert. Die Zellen wurden dann in 20 ml modifizierter HBSS \pm 10 mM Glucose einer Konzentration von 1 mM Spermin-NONO ausgesetzt. Die intrazelluläre Ascorbinsäure-Konzentration wurde zu Beginn des Experiments, nach 40 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden, 6 Stunden und 8 Stunden bestimmt, (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Experimenten mit Doppelbestimmung).

4 Diskussion

Stickstoffmonoxid und reaktive Stickstoffspezies sind im biologischen System durch Nitrosierungs/Nitrierungsreaktionen an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt [13,74]. Besonders die Nitrosierung von Thiol-Gruppen von Proteinen nimmt eine zentrale Rolle ein. Die Bildung von RS-NO Gruppen kontrolliert z.B. die Aktivität von Kanalproteinen und ist an der Regulation des Gefäßtonus und verschiedenen Immunprozessen beteiligt [40]. Im Zuge eines relativen oder absoluten Überangebotes an reaktiven Stickstoffspezies, z.B. N_2O_3 , kommt es jedoch zu einer inadäquaten RS-NO Bildung und damit zu einer Funktionseinschränkung der betroffenen Proteine [33,61,75]. Dieser Schädigung am zelleigenen Stoffwechselapparat können Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C, Vitamin E und Glutathion, im Falle eines Überangebotes an N_2O_3 entgegenwirken [14,62]. Diese antioxidativen Moleküle sind potente Reduktionsmittel, welche zum einen direkt reaktive Stickstoffspezies abfangen, zum anderen aber auch den stattgehabten Schaden an nitrosylierten/nitrosierten Biomolekülen durch Reduktion dieser Verbindungen rückgängig machen können [5,13,23].

Obwohl sowohl Ascorbinsäure als auch Glutathion direkt mit N_2O_3 reagieren können [13,21,31], war es bislang unklar, welches dieser beiden Moleküle den primären Partner in der Reaktion mit N_2O_3 darstellt. Zur Klärung dieser Frage ist die Quantifizierung der intrazellulären Nitrosierung durch N_2O_3 in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Antioxidantien notwendig. Zur Quantifizierung der intrazellulären Nitrosierung stand mit der Farbstoffgruppe der Diaminofluoresceine eine etablierte und verlässliche Messmethode zur Verfügung [35,37].

Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Oxidationsstufen des Vitamin C stand bislang kein einfach durchzuführendes und dabei valide Ergebnisse produzierendes Messverfahren zur Verfügung. Bislang konnten intrazelluläre Ascorbinsäurekonzentrationen effektiv durch chromatographische Methoden, wie z.B. HPLC, und Verfahren die auf der Anreicherung von Zellen mit ^{14}C -markierter Ascorbinsäure beruhen, bestimmt werden [38,69]. Diese Techniken sind jedoch relativ aufwendig, kompliziert und das erforderliche Instrumentarium steht nicht jedem biochemischen Labor zur Verfügung. Zudem kann mit Messmethoden wie der Kapillarelektrophorese, die Metabolite im elektrischen Spannungsfeld auftrennt, die Dehydroascorbinsäure nicht erfasst werden, da sie keine Ladung trägt [12,68,69].

Um die verschiedenen Oxidationsstufen des Vitamin C gemeinsam erfassen und die Anforderungen an die Laborausstattung so gering wie möglich halten zu können, wurden

bereits einige spektrophotometrische Verfahren zur Bestimmung von Vitamin C in biologischen Proben vorgestellt und teilweise auch kommerziell vertrieben [3,36,48]. Diese Protokolle erbringen jedoch zumeist unbefriedigende Ergebnisse, da es ihnen an Spezifität gegenüber den zu bestimmenden Verbindungen fehlt und sie zudem häufig sehr anfällig sind gegenüber Licht. Seit langem ist bekannt, dass bei der Reaktion von Dehydroascorbinsäure mit Methanol eine Vielzahl von Methylketalen mit einem gemeinsamen Extinktionsmaximum bei 346 nm entstehen [28,50]. Diese Reaktion wurde von Moeslinger *et al.* genutzt, um 1994 ein hochspezifisches Verfahren für den Nachweis von Dehydroascorbinsäure in Blutplasma und Zellkulturen vorzustellen [43]. Bei diesem Protokoll bedurfte es jedoch einer nicht-enzymatischen Kinetik und der Registrierung einer großen Zahl von Messpunkten [20,44]. In einer zweiten Veröffentlichung erklärten Moeslinger *et al.* [45], dass Ascorbinsäure nach diesem Protokoll ebenfalls detektiert werden kann, sofern zunächst eine Oxidation zu Dehydroascorbinsäure, z.B. mit L-Ascorbate-Oxidase (EC 1.10.3.3), erfolgt.

Wegen des weiterhin sehr komplizierten Rückschlusses auf die vorliegende Menge an Vitamin C aus einer nicht-enzymatischen Kinetik und aufgrund einer suboptimalen Aufarbeitung der biologischen Proben im Hinblick auf Proteindenaturierung und Stabilisierung des vorliegenden Gehaltes an Vitamin C setzte sich dieses Protokoll nicht durch.

4.1 Nachweis von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure mittels Einzelpunktmessung

Nach grundlegender Überarbeitung der Methanolmethode konnte sie an die Erfordernisse der Bestimmung von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in biologischen Proben und insbesondere in Zellkulturproben angepasst werden. Statt der komplizierten Kinetik mit einer Vielzahl an Datenpunkten kann jetzt eine Einzelpunktmessung durchgeführt werden, deren Validität die eines kommerziell vertriebenen Testansatzes übersteigt [2].

Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dehydroascorbinsäure zeigten, dass eine Messung der Absorption bei 346 nm auf dem unter 3.1.3 beschriebenen asymptotischen Plateau zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. 30 Minuten nach Beginn der Inkubation) gut mit der initial eingesetzten Konzentration von Dehydroascorbinsäure korrespondiert.

Darum ist die einfacher durchzuführende Einzelpunktmessung der komplexen kinetischen Analyse [44] bei gleicher Validität vorzuziehen. Zudem kann die Inkubationsperiode auch weiter ausgedehnt werden, da die Extinktion über einen längeren Zeitraum unverändert blieb

und, wie in 3.1.3 gezeigt, die Messwerte unterschiedlicher Konzentrationen gut zu den jeweiligen Zeitpunkten korrelieren. Dieser Befund ermöglicht es auch, eine größere Zahl von Proben parallel zu verarbeiten und gleichzeitig die vorgeschriebenen Inkubationszeiträume genau einzuhalten. Allerdings muß dabei bedacht werden, dass Methylketale langlebige Intermediate sind, deren Konzentration nach 60 Minuten Inkubationszeit abzunehmen beginnt [20].

Erstaunlicherweise reduzierte die Anwesenheit von Ascorbat-Oxidase leicht die Ausbeute an Methylketalen [2]. Dabei entstehen jedoch sowohl bei Inkubation mit Dehydroascorbinsäure als auch mit Ascorbinsäure in Gegenwart von Ascorbat-Oxidase gleiche Mengen an Methylketalen mit entsprechender Absorption. Die Kalibrierung mit Dehydroascorbinsäure sollte darum stets in Gegenwart des Enzyms durchgeführt werden [2].

Um die Verlässlichkeit der verbesserten Methanolmethode zu demonstrieren, wurde sie mit einer chromatographischen Methode, der Kapillarelektrophorese, und einem kommerziell vertriebenen spektrophotometrischen Vitamin C Test Kit verglichen [2]. Wie erwartet korrelierten die detektierbaren Konzentrationen von Ascorbinsäure bei allen Methoden in streng linearer Weise. Allerdings wich die Steigung der Regressionsgerade von einander ab, z.B. 0,999 mit der Kapillarelektrophorese, 0,985 bei der Methanolmethode und 0,834 bei dem kommerziellen Test [2]. Die Bestimmung von Ascorbinsäure in wässriger Lösung mittels Kapillarelektrophorese mag somit als Goldstandard gelten, jedoch lag der Anteil an wiedergefundener Ascorbinsäure mit der Methanolmethode sehr dicht an dem Ergebnis, das mit der Kapillarelektrophorese erzielt wurde. Die Methanolmethode benötigte aber nur einen Bruchteil der Bearbeitungszeit. Zudem kann mit der Kapillarelektrophorese die Dehydroascorbinsäure nicht detektiert werden, da sie als ungeladenes Molekül im Spannungsfeld nicht aufgetrennt werden kann. Als schwerstes Argument für die Benutzung der Methanolmethode wiegt jedoch, dass eine Bestimmung von Ascorbinsäure in biologischen Proben mit der Kapillarelektrophorese überaus schwierig ist. Durch Adsorptionsvorgänge an den Wänden der Probengefäße und der Kapillare und aufgrund des hohen Anteils geladener Moleküle im Zelllysate, kommt es zu derart starken Interferenzen, dass mit dem bestehenden Protokoll die Ascorbinsäure in biologischen Proben nicht quantifiziert werden kann. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wird Ascorbinsäure zumeist photometrisch mit einem kommerziellen Test bestimmt. Dieser kommerzielle Test ist jedoch keine Alternative zur Kapillarelektrophorese, da er die Ascorbinsäurekonzentration in wässriger Lösung um über 16 % unterschätzte.

Die Menge an detektierbarem Vitamin C in frisch abgenommenem und abzentrifugiertem Blutserum lag zwischen 46 μM und 97 μM . Diese Konzentrationen entsprechen früheren Berichten [24,29,71] und zeigten eine Abhängigkeit von Geschlecht und Ernährungsgewohnheiten der Blutspender. Nachdem die vorliegende Menge an Vitamin C durch wiederholtes Einfrieren und wieder Auftauen elimiert wurde, um einen identischen Nullwert zu schaffen, wurde das Serum mit verschiedenen Mengen an Vitamin C angereichert, um die Menge an bestimmbarer Ascorbinsäure detektieren zu können.

Im Rahmen physiologischer Konzentrationen wurde in allen Ansätzen die Majorität der eingesetzten Ascorbinsäure wiedergefunden. Die Korrelation war hoch ($r^2 > 0,996$) und die Steigung der Regressionsgerade war 1,004. Darum ist die Methanolmethode auch sehr gut zur Bestimmung von Vitamin C in Serumproben geeignet.

Es wurde bereits berichtet, dass Vitamin C in immortalisierten Zellkulturen nicht nachweisbar ist [11,26]. Tatsächlich konnte auch in L929-Mausfibroblasten weder Ascorbinsäure noch Dehydroascorbinsäure detektiert werden. Darum wurden die Zellen mit Konzentrationen von 0 – 400 μM Ascorbinsäure vorinkubiert, um physiologische intrazelluläre Vitamin C-Gehalte zu erreichen. Um zytotoxische Prozesse auszuschließen wurde die Inkubationsperiode auf 24 Stunden begrenzt. L929-Mausfibroblasten zeigten eine dosisabhängige, intrazelluläre Anreicherung von Ascorbinsäure. Die intrazelluläre Konzentration erreichte Spitzenwerte von $40,8 \pm 6,2$ nmol/mg Protein. Anhand der Tatsache, dass ein mg Protein einem Fibroblastenvolumen von 8,5 μl [8,9] entspricht, kann ausgerechnet werden, dass die intrazelluläre Ascorbinsäurekonzentration 10fach über der extrazellulären Konzentration liegt. Dieser Schluß unterstützt die Ergebnisse anderer Gruppen, dass die zelluläre Aufnahme von Ascorbinsäure [21,52,64-67] und Dehydroascorbinsäure [53,55,56,60,63] über Transporter erfolgt.

Bemerkenswerterweise detektierte das kommerzielle Testverfahren nur 37% der Ascorbinsäuremenge, die mit der Methanolmethode nachgewiesen werden konnte [2]. Unter den unter 3.1.3 beschriebenen Bedingungen war es nicht möglich, Ascorbinsäure in Zelllysaten oder Serum zu detektieren. Die zellulären und serösen Komponenten interferierten zu stark mit der Standardlösung.

Zusammenfassend ermöglicht die Methanolmethode die hochvalide Bestimmung von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in biologischen Proben (kultivierte Zellen, Serum) mittels Einzelpunktmessung. Der Zeitbedarf für die Bearbeitung und Messung der Proben ist minimiert, da verschiedene Ansätze parallel bearbeitet werden können. Ein jeder Probe

individuell zugeordneter Leerwert schließt Interferenzen mit anderen im Zelllysats/Serum vorliegenden Verbindungen sicher aus.

4.2 Bedeutung von Ascorbinsäure und Glutathion bei der intrazellulären Nitrosierung von DAF-2

Die mit der Methanolmethode erhobenen Befunde bildeten die Voraussetzung für eine sinnvolle Betrachtung des Einflusses von Ascorbinsäure auf intrazelluläre Nitrosierungsvorgänge durch N_2O_3 . Dank der Effektivität der Methanolmethode konnten die Wirkungen von Glucose auf die intrazellulären Spiegel von Ascorbinsäure in An- und Abwesenheit reaktiver Stickstoffspezies analysiert werden. In Gegenwart von Glucose liefert der Pentose-Phosphatweg Reduktionsäquivalente durch Reduktion von NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Diese Reduktionsäquivalente können ihrerseits primäre Antioxidantien regenerieren. Im Fall des Glutathions geschieht dies über die enzymatische Katalyse der Glutathion-Reduktase.

Auch die intrazellulären Spiegel der Ascorbinsäure werden in Gegenwart der Reduktionsäquivalente gesteigert. Ob die Reduktion der Dehydroascorbinsäure ebenfalls durch ein spezialisiertes Enzym im Sinne einer Dehydroascorbat-Reduktase stattfindet oder durch die spontane Reaktion mit Glutathion, ist bislang noch nicht schlüssig geklärt (Abb. 20).

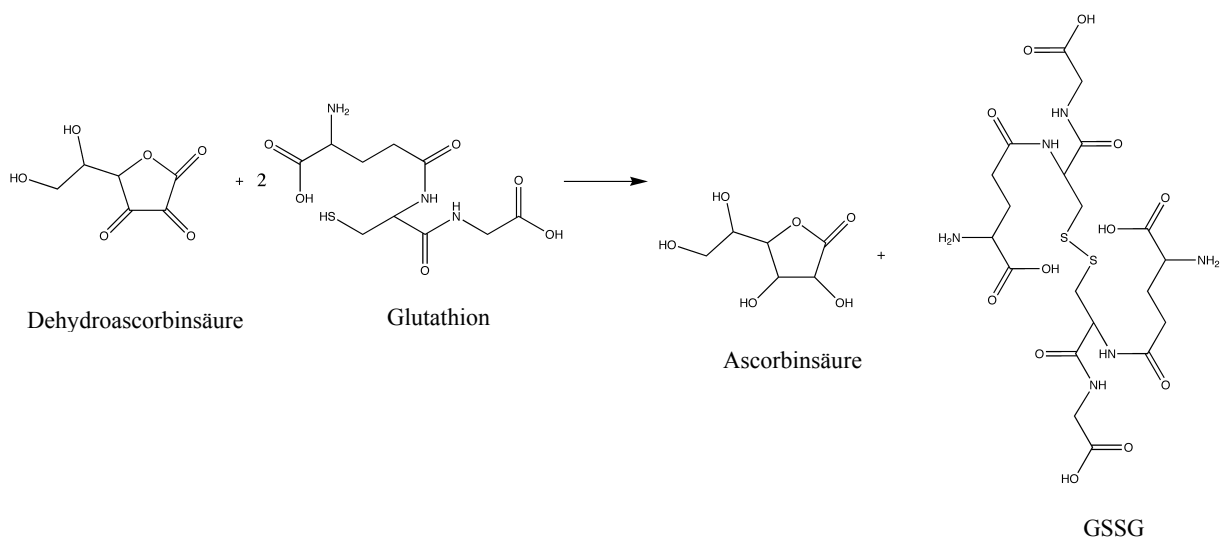


Abb. 20 Reduktion von Dehydroascorbinsäure unter Verbrauch von Glutathion.
Oxydierte Ascorbinsäure (Dehydroascorbinsäure) kann unter Verbrauch des Reduktionsmittels Glutathion reduziert werden.

Sowohl eine Vorinkubation mit 200 μM Ascorbinsäure als auch die Gegenwart von 10 mM Glucose im Reaktionspuffer vermögen den Anstieg der Fluoreszenz von DAF-2T um den gleichen Betrag zu reduzieren. Eine mögliche Erklärung basiert auf der Annahme, dass selbst minimale (nicht mehr detektierbare) Ascorbinsäuremengen in L929-Zellen N_2O_3 abfangen und dass die gebildete Dehydroascorbinsäure rasch durch die ungleich größere Menge an zellulärem Glutathion reduziert wird. Glutathion wiederum wird durch die Bereitstellung von $\text{NADPH}+\text{H}^+$ nach Zugabe von Glucose ständig regeneriert.

Die maximale Reduktion des Anstiegs der Fluoreszenz wird durch eine Vorinkubation mit 200 μM Ascorbinsäure bei gleichzeitiger Anwesenheit von 10 mM Glucose erreicht. Da dieser Effekt keine reine Addition der Wirkungen von Ascorbinsäure und Glutathion ist, wird durch die Umöglichkeit deutlich, diesen Effekt durch Vorinkubation mit 200 μM BSO [60] zu reduzieren. Durch eine 24-stündige Hemmung der Glutathion-Reduktase sind die GSH-Spiegel in der Zelle erniedrigt. Schon diese kleinen Mengen Glutathion, die über den Glucosestoffwechsel rasch regeneriert werden, könnten ausreichen, einen Teil der Ascorbinsäure ständig im reduzierten Zustand zu halten. Dieser reduzierte Anteil der Ascorbinsäure wäre demnach der primäre Angriffspunkt von N_2O_3 in L929-Zellen und könnte dessen zytotoxisches Potential, gezeigt am Beispiel der Nitrosierung von DAF-2, signifikant reduzieren. Diese zentrale Rolle der Ascorbinsäure lässt sich auch anhand des Verlaufes der intrazellulären Spiegel gut nachvollziehen. Unter der Einwirkung von 1 mM Spermin-NONO fallen die intrazellulären Ascorbinsäurespiegel in Abwesenheit von Glucose rasch unter die Nachweisgrenze ab, scheinen jedoch noch in Resten präsent zu sein, da Ascorbinsäure alleine den Anstieg der DAF-2-Fluoreszenz und damit die intrazelluläre Nitrosierung deutlich vermindern kann.

In Gegenwart von Glucose kommt es zwar ebenfalls zu einem Abfall des intrazellulären Ascorbinsäuregehaltes, jedoch pendeln sich die intrazellulären Gehalte auf einem Niveau von 10 nmol/mg Protein ein. Dieser Verlauf spiegelt umgekehrt die intrazelluläre Nitrosierung wieder. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass Ascorbinsäure das primäre Antioxidans gegenüber N_2O_3 in L929-Mausfibroblasten ist, dass sie jedoch ihr maximales antioxidatives Potential nur in Gegenwart von Glutathion ausüben kann, da nur unter diesen Bedingungen eine stete Reduktion von Dehydroascorbinsäure gewährleistet ist. Hierbei reichen wahrscheinlich schon kleine Mengen an Glutathion aus, da seine zentrale Bedeutung eine Bindegliedfunktion zwischen Ascorbinsäure- und Glucosestoffwechsel zu sein scheint (Abb. 21).

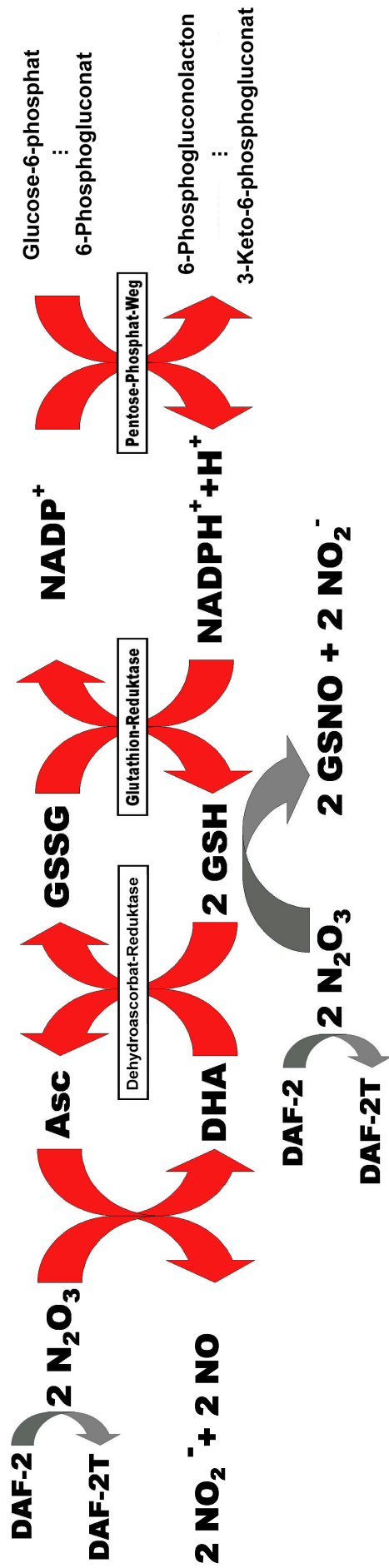


Abb. 21 Ascorbinsäure ist das primäre Antioxidans für intrazelluläres N_2O_3 in L929-Zellen.

Der Fluoreszenzfarbstoff 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2) permeiert die Zellmembran und kann somit zum intrazellulären Nachweis von Nitrosierungsreaktionen bzw. zu deren Unterdrückung durch vorherige Neutralisation von N_2O_3 durch zelleigene Antioxidantien genutzt werden. Sowohl Ascorbinsäure als auch Glutathion können direkt mit N_2O_3 reagieren, wobei als Hauptprodukte NO_2^- , NO und Dehydroascorbinsäure bzw. Nitrosglutathion entstehen. Somit geht aus der Reaktion von N_2O_3 mit Ascorbinsäure ein physiologischer Metabolit, NO, hervor. Oxidierte Ascorbinsäure kann unter Glutathion-Verbrauch reduziert werden. Dabei ist es noch strittig, ob dies direkt oder unter Katalyse eines spezialisierten Enzyms im Sinne einer Dehydroascorbat-Reduktase geschieht. Oxidiertes Glutathion kann durch Reduktionsäquivalente, die aus dem Glukose-Stoffwechsel bereit gestellt werden (z.B. $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$), reduziert werden. Durch BSO kann das Enzyms Glutathion-Reduktase gehemmt und dadurch die Reduktion von oxidiertem Glutathion effektiv vermindert werden.

Zusammenfassung

Reaktive Stickstoffspezies sind im belebten System an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Stoffwechselprozesse beteiligt. Im Zuge eines Überangebotes an reaktiven Stickstoffspezies kann es zu einer Nitrierung/Nitrosierung zelleigener Moleküle und somit zu einer Schädigung des zell- bzw. körpereigenen Stoffwechselapparates kommen. Dieser Schädigung wirken Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C und Glutathion, durch direktes Abfangen oder Reduktion der nitrosierten Biomoleküle entgegen. Bislang war es unklar, ob Ascorbinsäure oder Glutathion das primäre Ziel in der Reaktion mit N_2O_3 darstellt. Zur Klärung der Frage nach dem primären Target kann in der vorliegenden Arbeit erstmals die Quantifizierung der intrazellulären Nitrosierung durch N_2O_3 in Abhängigkeit von den Antioxidantien Ascorbinsäure und Glutathion und die Bedeutung von Glucose für diese Reaktionen auf Einzelzelebene am Beispiel von L929-Mausfibroblasten gezeigt werden.

Zudem wird das Verhalten der intrazellulären Ascorbinsäurekonzentrationen unter der Einwirkung von N_2O_3 dargestellt. Hierzu wurde eigens ein neuartiges spektrophotometrisches Testverfahren konzipiert. Dieser an die bereits bekannte Methanolmethode angelehnte Algorithmus ist an die Erfordernisse der Bestimmung von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in biologischen Proben und insbesondere in Zellkulturproben angepasst. Er gründet auf einer einfach durchzuführenden Einzelpunktmessung, deren Validität die eines kommerziell vertriebenen Testansatzes übersteigt und nur wenig der Genauigkeit der Bestimmung von Vitamin C mittels Kapillarelektrophorese nachsteht. Der Zeitbedarf für die Bearbeitung und Messung der Proben ist minimiert, da verschiedene Ansätze parallel bearbeitet werden können. Ein jeder Probe individuell zugeordneter Leerwert schließt Interferenzen mit anderen im Zelllysate/Serum vorliegenden Verbindungen aus. Teure Chemikalien oder kosten-/bzw. bedienungsintensive Gerätschaften werden nicht benötigt.

Die durchgeführten Untersuchungen weisen auf Ascorbinsäure als das primäre Antioxidans gegenüber N_2O_3 in L929-Mausfibroblasten hin. Ihr maximales antioxidatives Potential entfaltet Ascorbinsäure jedoch nur in Gegenwart von Glutathion, da nur unter diesen Bedingungen eine stete Reduktion von Dehydroascorbinsäure gewährleistet ist. Hierbei reicht schon eine kleine Menge Glutathion aus, da seine zentrale Bedeutung eine Bindegliedfunktion zwischen Ascorbinsäure- und Glucosestoffwechsel zu sein scheint.

Literaturverzeichnis

1. Aukrust, P.; Müller, F.; Svardal, A. M.; Ueland, T.; Berge, R. K.; Froland, S. S. Disturbed glutathione metabolism and decreased antioxidant levels in Human Immunodeficiency Virus-Infected patients during Highly Active Antiretroviral Therapy - potential immunomodulatory effects of Antioxidans. *J. Infect. Dis.* 2003;188, 232-238.
2. Badrakhan, C.-D.; Petrat, F.; Holzhauser, M.; Fuchs, M.; Lomonosova, E.; de Groot, H.; Kirsch, M. The methanol method for the quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2004;58[3], 207-218.
3. Beckmann, J. S., Carson, M., Smith, C. D., and Koppenol, W. H. ALS, SOD and Peroxynitrite. *Nature* 1993;364:584.
4. Bergmeyer, H., *Methods of Enzymatic Analysis*. third ed. Verlag Chemie; 1983.(2).
5. Beyer, R. The Role of Ascorbate in Antioxidant Protection of Biomembranes: Interactions With Vitamin E and Coenzyme Q. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994;26:349-58.
6. Bianchi, J., Wilson, F. A., and Rose, R. C. Dehydroascorbic Acid and Ascorbic Acid Transport Systems in the Guinea Pig Ileum. *Am. J. Physiol.* 1985;250(G):461-468.
7. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
8. Dall'Asta, V.; Rossi, P. A.; Bussolati, O.; Gazzola, G. C. Response of human fibroblasts to hypertonic stress. Cell shrinkage is counteracted by an enhanced active transport of neutral amino acids. *J. Biol. Chem.* 1994;269, 10485-10491.
9. Dall'Asta, V.; Rossi, P. A.; Bussolati, O.; Gazzola, G. C. Regulatory volume decrease of cultured human fibroblasts involves changes in intracellular amino-acid pool. 1994; *Biochim. Biophys. Acta* 1220, 139-145.

10. Daruwala, R., Song, J., Koh, W. S., Rumsey, S. C., and Levine, M. Cloning and Functional Characterization of the Human Sodium-Dependent Vitamin C Transporters HSVCT1 and HSVCT2. *FEBS Lett.* 1999;460:480-484.
11. Dayton, P. G., McMillan Snell, M., and Perel, J. M. Ascorbic and Dehydroascorbic Acids in Guinea Pigs and Rats. *J. Nutrition* 1966;88:338-344.
12. Dhariwal, K. R., Washko, P. W., and Levine, M. Determination of Dehydroascorbic Acid Using High-Performance Liquid Chromatography With Colometric Electrochemical Detection. *Anal. Biochem.* 1990;189:18-23.
13. Espey, M. G., Miranda, K. M., Thomas, D. D., and Wink, D. A. Distinction Between Nitrosating Mechanisms Within Human Cells and Aqueous Solution. *J. Biol. Chem.* 2001;1:131-137.
14. Frei, R. B.; England, L.; Ames, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989;86, 6377-6381.
15. Gero, E. Oxydation Enzymatique Et Non Enzymatique Du Diphosphopyridine Nucleotide Reduit En Presence D'Acide L-Ascorbique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1967;49(7):907-911.
16. Gero, E. and Candido, A. Purification De La Réductase Déhydroascorbique Du Chou-Fleur (*Brassica Oleracea* L.). *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1967;49(12):1895-1897.
17. Gero, E. Purification De La Réductase I (Déhydroascorbique) Du Chou-Fleur. Quelques Caracteristiques De L'Enzyme Purifiée. *Ann. Nutr. Alim.* 1968;22:69-70.
18. Gero, E. and Candido, A. Determination Du Poids Moléculaire De La Reduktase Dehydroascorbique Du Chou-Fleur Par Filtration Sur Sephadex G 100. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1969;51(1):194-196.
19. Gero, E. and Candido, A. Une Technique Chimique De Dosage De L'Acide Ascorbique Total Par Une Reaction D'Oxydo-Reduction. *J. Internat. Vitaminol.* 1969;39(3):252-258.
20. Goldenberger, H., Jirovetz, L., Krajnik, P., Mosgoeller, W., Moeslinger, T., and Schweinzer, E. Quantitation of Dehydroascorbic Acid by the Kinetic Measurement of a Derivatization Reaction. *Anal. Chem.* 1994;66:1086-1089.

21. Guaiquil, V. H., Farber, C. M., Golde, D. W., and Vera, J. C. Efficient Transport and Accumulation of Vitamin C in HL-60 Cells Depleted of Glutathione. *J. Biol. Chem.* 1997;272(15):9915-9921.
22. Heller, R.; Münscher-Pauling, F.; Gräbner, R.; Till U. L-ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1999;274, 8254-8260.
23. Holmes, A. J.; Williams, D. L. H. Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *J. Chem. Soc.* 2000;2, 1693-1644.
24. Hornig, D., Weiser, H., Weber, F., and Wiss, O. Uptake and Release of [I-14C] Ascorbic Acid and [I-14C] Dehydroascorbic Acid by Leukocytes of Guinea Pigs. *Clin. Chim. Acta* 1971;32:33-39.
25. Hornig, D. Distribution of Ascorbic Acid, Metabolites and Analogues in Man and Animal. *Ann. N.Y. Acad. Science* 1975;258:103-118.
26. Huang, A., Vita, J. A., Venema, R. C., and Keany Jr, J. F. Ascorbic Acid Enhances Endothelial Nitric-Oxide Synthase Activity by Increasing Intracellular Tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* 2000;275(23):17399-17406.
27. Kawanishi, T., Nieminen, A. L., Herman, B., and Lemasters, J. J. Suppression of Ca²⁺ Oscillations in Cultured Rat Hepatocytes by Chemical Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1991;266:20062-20069.
28. Kenyon, J. and Munro, N. The Isolation and Some Properties of Dehydro-L-Ascorbic Acid. *J. Chem. Soc.* 1948;158.
29. Khoja, S. M. and Marzouki, Z. M. H. Effect of Vitamins C and E Intake on Plasma Lipid Concentration in Rats. *Ann. Saudi Med.* 1994;14(5):371-374.
30. Kirsch, M. and de Groot, H. Reaction of Peroxynitrite With Reduced Nicotinamide Nucleotides, the Formation of Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* 1999;274(35):24664-24670.
31. Kirsch, M. and de Groot, H. Ascorbate Is a Potent Antioxidant Against Peroxynitrite-Induced Oxidation Reactions. *J. Biol. Chem.* 2000;275(22):16702-16708.

32. Kirsch, M.; Korth, H.-G.; Sustmann, R.; de Groot, H. The pathobiochemistry of nitrogen dioxide. *Biol. Chem.* 2002;383, 389-399.
33. Kirsch, M.; Fuchs, A.; de Groot, H. Regiospecific nitrosation of N-(terminal) blocked tryptophan derivatives by N_2O_3 at physiological pH. *J. Biol. Chem.* 2003;278, 11931-11936.
34. Knowles, R. G. and Moncada, S. Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochem. J.* 1994;298:249-258.
35. Kojima, H., Hirotani, M., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., and Nagano, T. Fluorescent Indicators for Nitric Oxide Based on Rhodamine Chromophore. *Tetrahedron Lett.* 2000;41:69-72.
36. Koshiishi, I. and Imanari, T. Measurement of Ascorbate and Dehydroascorbate Contents in Biological Fluids. *Anal. Chem.* 1997;69:216-220.
37. Koshiishi, I., Mamura, Y., Liu, J., and Imanari, T. Evaluation of an Acidic Deproteinization for the Measurement of Ascorbate and Dehydroascorbate in Plasma Samples. *Clin. Chem.* 1998;44(4):863-868.
38. Lee, W., Hamernyik, P., Hutchinson, M., Raisys, V. A., and Labbe, R. F. Ascorbic Acid in Lymphocytes: Cell Preparation and Liquid-Chromatographic Assay. *Clin. Chem.* 1982;28(10):2165-2169.
39. Lykkesfeldt, J., Loft, S., and Poulsen, H. D. Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography With Coulometric Detection - Are They Reliable Biomarkers of Oxidative Stress? *Anal. Biochem.* 1995;229:329-335.
40. Mannick, J. B.; Schonhoff, C. M. Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch. Biochem. Biophys.* 2002;408, 1-6.
41. Meister, A. Glutathione-Ascorbic Acid Antioxidant System in Animals. *J. Biol. Chem.* 1994;269:9397-9400.
42. Mirvish, S. S.; Wallcave, L.; Eagen, M.; Shubik, P. Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science* 1972;177, 65-68.

43. Moeslinger, T., Brunner, M., and Spieckermann, P. G. Spectrophotometric Determination of Dehydroascorbic Acid in Biological Samples. *Anal.Biochem.* 1994;221:290-296.
44. Moeslinger, T., Brunner, M., Volf, I., and Spieckermann, P. G. Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid. *Clin.Chem.* 1995;41(8):1177-1181.
45. Mukai, K., Nishimura, M., and Kikuchi, S. Stopped-Flow Investigation of the Reaction of Vitamin C With Tocopheroxyl Radical in Aqueous Triton X-100 Micellar Solutions. *J. Biol. Chem.* 1991;266(1):274-278.
46. Murphy, M. E., Piper, H. M., Watanabe, H., and Sies, H. Nitric Oxide Production by Cultured Aortic Endothelial Cells in Response to Thiol Depletion and Replenishment. *J. Biol. Chem.* 1991;266:19378-19383.
47. Nakatsubo, N., Kojima, H., Kikuchi, K., Nagoshi, H., Hirata, Y., Maeda, D., Imai, Y., Irimura, T., and Nagano, T. Direct Evidence of Nitric Oxide Production From Bovine Aortic Endothelial Cells Using New Fluorescence Indicators: Diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 1998;427:263-266.
48. Okamura, M. An Improved Method for Determination of L-Ascorbic Acid and L-Dehydroascorbic Acid in Blood Plasma. *Clin. Chim. Acta* 1979;103:259-268.
49. Papp, Z. G., Saroglia, M., and Terova, G. An Improved Method for Assay of Vitamin C in Fish Feed and Tissues. *Chromatographia* 1998;48:43-47.
50. Pecherer, B. The Preparation of Dehydro-L-Ascorbic Acid and Its Methanol Complex. Some Reactions of Dehydro-L-Ascorbic Acid. *J. Amer. Chem. Soc.* 1951;73:3827.
51. Puskas, F., Gergely Jr, P., Banki, K., and Perl, A. Stimulation of the Pentose Phosphate Pathway and Glutathione Levels by Dehydroascorbate, the Oxidized Form of Vitamin C. *FASEB* 2000;14:1352-1361.
52. Rice, M. E.; Perez-Pinzon, M. A.; Lee, E. J. K. Ascorbic acid, but not glutathione, is taken up by brain slices and preserves cell morphology. *J. Neurophysiol.* 1994;1591-1596.

53. Rivas, C. I., Vera, J. C., Guaiquil, V. H., Velasquez, F. V., Borquez-Ojeda, O. A., Carcamo, J. G., Concha, I. I., and Golde, D. W. Increased Uptake and Accumulation of Vitamin C in Human Immunodeficiency Virus 1-Infected Hematopoietic Cell Lines. *J. Biol. Chem.* 1997;272(9):5814-5820.
54. Rose, R. C. and Nahrwold, D. L. Quantitative Analysis of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 1981;114:140-145.
55. Rose, R. C., Choi, J.-L., and Koch, M. J. Intestinal Transport and Metabolism of Oxidized Ascorbic Acid (Dehydroascorbic Acid). *Am. J. Physiol.* 1988;254(G):824-828.
56. Rumsey, S. C., Kwon, O., Xu, G. W., Burant, C. F., Simpson, I., and Levine, M. Glucose Transporter Isoforms GLUT1 and GLUT3 Transport Dehydroascorbic Acid. *J. Biol. Chem.* 1997;272(30):18982-18989.
57. Sandoval, M., Zhang, X.-J., Liu, X., Mannick, E. E., Clark, D. A., and Miller, M. J. S. Peroxynitrite-Induced Apoptosis in T84 and RAW 264.7 Cells: Attenuation by L-Ascorbic Acid. *Free Radic. Biol. Med.* 1997;22(3):489-495.
58. Souici, A.-C., Mirkovitch, J., Hausel, P., Keefer, L. K., and Felley-Bosco, E. Transition Mutation in Codon 248 of the P53 Tumor Suppressor Gene Induced by Reactive Oxygen Species and a Nitric Oxide-Releasing Compound. *Carcinogenesis* 2000;21(2):281-287.
59. Squadrito, G. L. and Pryor, W. A. Oxidative Chemistry of Nitric Oxide: the Roles of Superoxide, Peroxynitrite, and Carbon Dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* 1998;25:392-403.
60. Stahl, R. L., Liebes, L. F., and Silber, R. A Reappraisal of Leukocyte Dehydroascorbate Reduktase. *Biochim. Biophys. Acta* 1985;839:119-121.
61. Stamler, J. S. S-Nitrosothiols in the blood - Roles, amounts and methods of analysis. *Circ. Res.* 2004;94, 414-417.
62. Tannenbaum, S. R. Preventive Action of Vitamin C in Nitrosamine Formation. *Internat. J. Vit. Nutr. Res. Sup.* 1989;30:109-113.

63. Van Duijn, M. M., Van der Zee, J., Van Steveninck, J., and Van den Broeck, P. J. A. Ascorbate Stimulates Ferricyanide Reduction in HL-60 Cells Through a Mechanism Distinct From NADH-Dependent Plasma Membrane Reduktase. *J. Biol. Chem.* 1998;273(22):13415-13420.
64. Vera, J. C., Rivas, C. I., Fishbarg, J., and Golde, D. W. Mammalian Facilitative Hexose Transporters Mediate the Transport of Dehydroascorbic Acid. *Nature* 1993;364:79-82.
65. Vera, J. C., Rivas, C. I., Zhang, R. H., Farber, C. M., and Golde, D. W. Human HL-60 Myeloid Leukemia Cells Transport Dehydroascorbic Acid Via the Glucose Transporters and Accumulate Reduced Ascorbic Acid. *Blood* 1994;84(5):1628-1634.
66. Vera, J. C., Rivas, C. I., Velasquez, F. V., Zhang, R. H., Concha, I. I., and Golde, D. W. Resolution of the Facilitated Transport of Dehydroascorbic Acid From Its Intracellular Accumulation As Ascorbic Acid. *J. Biol. Chem.* 1995;270(40):23706-23712.
67. Vera, J. C., Reyes, A. M., Carcamo, J. G., Velasquez, F. V., Rivas, C. I., Zhang, R. H., Strobel, P., Iribarren, R., Scher, H. I., Slebe, J. C., and Golde, D. W. Genistein Is a Natural Inhibitor of Hexose and Dehydroascorbic Acid Transport Through the Glucose Transporter, GLUT1. *J. Biol. Chem.* 1996;271(15):8719-8724.
68. Washko, P. W., Hartzell, W. O., and Levine, M. Ascorbic Acid Analysis Using High-Performance Liquid Chromatography With Coulometric Electrochemical Detection. *Anal. Biochem.* 1989;181:276-282.
69. Washko, P. W., Welch, R. W., Dhariwal, K. R., Wang, Y., and Levine, M. Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid Analyses in Biological Samples. *Anal. Biochem.* 1992;204:1-14.
70. Wells, W. W., Xu, D. P., Yang, Y., and Rocque, P. A. Mammalian Thioltransferase (Glutaredoxin) and Protein Disulfide Isomerase Have Dehydroascorbate Reduktase Activity. *J. Biol. Chem.* 2002;265(26):15361-4.
71. Wirths, W. Vitamin C Intake and Vitamin C Supply of Apprentices in an Apprentice Home in Cologne. *Internat. J. Vit. Res.* 1969;39.
72. Wolfe, S. K. and Swinehart, J. H. Photochemistry of Pentacyanonitrosylferrate (2-). Nitroprusside. *Inorg. Chem.* 1975;14(5):1049-1053.

73. Wolff, J. A., Barshop, B., and Nyhan, W. L. Effects of Ascorbic Acid in Alkaptonuria: Alterations in Benzoquinone Acetic Acid and an Ontogenic Effect in Infancy. *Pediatr. Res.* 1989;26:140-144.
74. Wu, G. and Morris Jr, S. M. Arginine Metabolism: Nitric Oxide and Beyond. *Biochem. J.* 1998;336:1-17.
75. Xian, M.; Chen, X.; Liu, Z.; Wang, K.; Wang, P. G. Inhibition of papain by S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* 2000;275[27], 20467-20473.

Abkürzungsverzeichnis

BSO	Buthioninsulfoximin
DAF-2	4,5-Diaminofluorescein
DAF-2-DA	4,5-Diaminofluorescein-Diacetat
DHA	Dehydroascorbinsäure
MEM	Minimum Essential Medium
HBSS	Hank's Balanced Salt SolutionDanksagung

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. H. de Groot für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Präsentation der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. M. Kirsch für die interessante Themenstellung, seine wertvollen Ratschläge und für die große Geduld durch die sich seine Betreuung während der Durchführung der Experimente und der Erstellung dieser Arbeit auszeichnete.

Außerdem möchte ich Frau Dr. A. Fuchs für die freundliche Einarbeitung in die Methoden der Zellkultur und die fortwährende Beratung auch in späteren Abschnitten dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. F. Petrat danke ich für die Hilfestellung bei den Experimenten am Video-Mikroskop und besonders für die überaus hilfreiche Kritik beim Abfassen dieser Dissertation. Für die Unterstützung bei der Gestaltung des Einbandes bin ich Frau Dr. U. Kerckweg sehr verbunden.

Frau A. Wensing danke ich für die Einführung in die Bedienung der Messgeräte und damit dafür, dass die Durchführung der Experimente folgenlos für die Unversehrtheit aller Beteiligten und des Instrumentariums des Instituts für Physiologische Chemie geblieben ist.

Nicht zuletzt möchte ich allen weiteren Mitarbeitern am Institut für Physiologische Chemie für das freundliche Arbeitsklima und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Lebenslauf

Curd-David BADRAKHAN

wohnhaft in Duisburg

geboren am 10. Juli 1976 in Bochum

Staatsangehörigkeit: deutsch

ledig

Zivildienst von Juli 1996 bis August 1997 im Krankenhaus Evang. Stift St. Martin in Koblenz

AUSBILDUNG

seit Oktober 2004	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II (Hämatologie/Onkologie) des St. Johannes Hospitals Duisburg
September 2004	Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik II (Hämatologie/Onkologie) des St. Johannes Hospitals Duisburg
Januar bis August 2004	Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik I (Klinische Infektiologie) des Klinikums der Universität zu Köln
November 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 1999	Ärztliche Vorprüfung
September 1997	Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Essen
Juni 1996	Abitur (Leistungskurse: Englisch, Biologie und Sozialkunde)
1987 – 1996	Staatliches Hilda-Gymnasium in 56068 Koblenz

PRAKTIKA

Juni bis September	2003	PJ-Tertial (Wahlfach) in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Essen
-----------------------	------	--

Februar bis Juni	2003	PJ-Tertial (Chirurgie) am „Centre hospitalier universitaire de Bicêtre“ der Universität Paris-sud (Paris XI) in Kremlin-Bicêtre, Frankreich
Oktober 2002 bis Februar	2003	PJ-Tertial (Innere Medizin) am Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Essen
März	2002	Famulatur in der allgemein- und notfallmedizinischen Klinik „International SOS“ in Hanoi, Vietnam
September bis Oktober	2001	Famulatur in einer gynäkologischen Privatpraxis und den gynäkologischen Abteilungen der Klinik der Universität von Kairo und dem Misr International Hospital in Kairo, Ägypten
März bis April	2001	Famulatur in der Klinik für Visceral- und Gefäßchirurgie des Krankenhaus Evang. Stift St. Martin in 56068 Koblenz
Oktober	2000	Sonographie-Intensivkurs Abdomen am Institut für Diagnostische Radiologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
September	2000	Famulatur in der allgemeinmedizinischen Praxis von Dr. med. L. Mohr-Remacle in 45147 Essen

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

Wintersemester 2000 bis Wintersemester 2003	studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie, Ultraschallkurs (Schwerpunkt Abdomen-Sonographie)
Sommersemester 2000 bis Sommersemester 2002	studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie, Einführung in die Klinische Medizin (Teilbereich Anatomie)
Februar 2000 bis März 2001	experimentelle Arbeit im Rahmen der Promotion am Institut für Physiologische Chemie (AG Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot) der Universität Essen
Wintersemester 1999/2000	studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie, Kursus der Makroskopischen Anatomie (Teil II, Präparierkurs)
1997-2003	studentische Aushilfe im Pflegedienst des Gesundheitszentrums Evang. Stift St. Martin in 56068 Koblenz

STIPENDIEN

Februar bis
Juni 2003

ERASMUS-Stipendium zum Studium am „Centre hospitalier universitaire de Bicêtre“ der Universität Paris-sud (Paris XI) in Kremlin-Bicêtre, Frankreich

Sommersemester 2000

IFORES Promotionsstipendium der Universität Essen

VERÖFFENTLICHUNGEN

- Publikation

Badrakhan CD, Petrat F, Holzhauser M, Fuchs A, Lomonosova EE, de Groot H, Kirsch M. The methanol method for the quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples. J Biochem Biophys Methods. 2004 Mar 31;58(3):207-18

- Vortrag (Dezember 2002)

„Der Einfluss von Ascorbinsäure und Glucose auf die N_2O_3 -vermittelte Nitrosierung von DAF-2“ (Curd-David Badrakhan, Frank Petrat, Michael Kirsch und Herbert de Groot) beim „1. Xantener Gespräch zur Medizinisch-Biologischen Chemie. Molekulare Wechselwirkungen in höher organisierten Systemen“ (Sonderforschungsbereich 452)

SPRACHEN

Deutsch
Englisch
Französisch
Kurdisch
Arabisch

BESONDERE KENNTNISSE

	Abdomensonographie
Labortechniken	Zellkultur Spektrophotometrie Kapillarelektrophorese Videomikroskopie
Computer	Windows Microsoft Office Internet